

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510220

研究課題名（和文） 哺乳類胚におけるエピゲノム制御のシステムレベルでの解析

研究課題名（英文） System level analysis of epigenomic regulation in mammalian embryo

研究代表者

熊木 勇一 (KUMAKI YUICHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50455341

研究成果の概要（和文）：DNAのメチル化は哺乳類の発生に必須であるが、その直接的な機能については未だ不明な点が多い。そこで、DNAメチル化酵素を欠損したES細胞及び分化した中胚葉経細胞、栄養膜幹細胞を用い、野生株細胞と比較し、遺伝子発現及びヒストン修飾のゲノムワイドな解析を行った。その結果、遺伝子発現、ヒストン修飾状態のどちらについても、DNAメチル化の消失よりも主として細胞種の違いに依存すること、遺伝子群によりDNAメチル化の消失に対する感受性が異なることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cytosine methylation at CpG site of genomic DNA is indispensable for mammalian development. However, a direct role of DNA methylation remains unclear. To reveal the effect of DNA methylation, we performed genome-wide analysis of gene expression and histone modifications of ES cells, differentiated mesodermal cells, nuclear transferred TS cells deficient for DNA methyltransferases. We found that the effect of DNA methylation loss on global expression profiles are modest, while global tendency of promoter histone modifications, especially H3K27me3, is sensitive to DNA methylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学、システムゲノム科学

キーワード：エピゲノム制御、エピジェネティクス、DNAメチル化、ヒストン修飾、システムバイオロジー、バイオインフォマティクス

## 1. 研究開始当初の背景

発生や分化といった生命のシステムは、多数の遺伝子が絡み合った遺伝子発現制御のネットワークによって実現されている。近年、発生・分化の遺伝子発現制御においてエピジェネティックな発現制御機構が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあ

る。つまり、発生・分化によりゲノムのエピジェネティックな状態が変化することで、遺伝子発現制御ネットワークの状態も変化する。ゲノムDNAのメチル化およびヒストン修飾はエピジェネティックな遺伝子発現制御機構であり、発生や分化に代表される重要な生命現象や、がん代表される疾病に、エピ

ジェネティックな状態が関与していることが明らかになってきている。また、哺乳類初期胚においてはエピジェネティックな状態の再編成が行われ、発生段階・細胞系列特異的に大規模に変化することが知られている。そのため、ES細胞やiPS細胞における多能性の獲得・維持、及び、分化における多能性の喪失について、ゲノムDNAのメチル化およびヒストン修飾との関連性を調べる研究が盛んに進められている。したがって、発生・分化をシステムレベルで理解するためには、発生・分化の過程における個々の遺伝子についての発現制御を調べるのみならず、ゲノムDNAのメチル化、ヒストンの修飾といったエピジェネティックな状態の変化をゲノムワイドに調べる必要がある。

本研究課題の申請時には、欧米諸国において、ゲノムDNAのメチル化に代表されるエピジェネティックなゲノムの変化を調べる、エピゲノム解析のプロジェクトが複数立ち上がっていた(Beck, S. & Rakyar, V. K., Trends in Genetics, 2008, The American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force & European Union, Network of Excellence, Scientific Advisory Board, Nature, 2008)。それに対し、日本国内においてはエピゲノム解析は立ち遅れており、エピゲノム解析を促進していくことは急務であった。また、エピゲノムのようなゲノムワイドな解析を行う上では、生物学的実験のみならず、バイオインフォマティクス解析等のコンピュータを用いた解析も組み合わせたシステムバイオロジーによる戦略が必須である(Bock, C. and Langauer, T, Bioinformatics, 2008)。しかしながら、これまでに日本国内においては、エピジェネティクスの分野にバイオインフォマティクスやシステムバイオロジーのバックグラウンドを持つ研究者がほとんど参入してきておらず、このことは日本におけるエピゲノム解析が立ち遅れている原因の一つになっていると考えられる。

申請者は生物学的実験による研究とバイオインフォマティクスによる研究の両方のバックグラウンドを持ち、両者を組み合わせたシステムバイオロジーによる研究を行ってきた。そこで、このバックグラウンドを生かし、システムバイオロジーのアプローチにより、DNAメチル化及びヒストン修飾についてのエピゲノム解析を行うことを目指した。

## 2. 研究の目的

ゲノムDNAのメチル化は、エピジェネティックな遺伝子発現制御システムであり、発生や分化に代表される重要な生命現象や疾病への関与が明らかになりつつある。このゲノムDNAのメチル化により染色体における遺伝

子発現制御は変化し、遺伝子の発現・制御のネットワークは大きな影響を受けている。したがって遺伝子の発現・制御のネットワークを明らかにするためには、発生・分化といった細胞の状態変化時におけるゲノムDNAのメチル化の変化をゲノムワイドに調べる必要があった。そこで、本研究では哺乳類胚由来の(1)微量のゲノムDNAからゲノムワイドにDNAメチル化状態を解析する実験的手法を開発・確立することで、これまで困難だった哺乳類胚におけるエピゲノム解析を可能とし、また(2)エピジェネティックな遺伝子発現制御を解析するためのバイオインフォマティクス手法を開発、これらの生物学的実験とバイオインフォマティクスを組み合わせたシステムバイオロジーのアプローチを用いることにより、(3)哺乳類胚におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御ネットワークのシステムを理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、以下の実験手法及びバイオインフォマティクス解析手法により研究を行った。

- (1) 研究代表者が参加した研究によりDNAメチル化酵素欠損栄養膜幹細胞を細胞核移植により樹立した(Sakaue, M., Ohta, H., et al., Current Biology, 2010)。
- (2) DNAメチル化酵素欠損ES細胞を分化させ、Flk1陽性細胞を回収することで、効率よく均一な中胚葉系細胞を回収する系を確立した。
- (3) DNAメチル化酵素欠損ES細胞、中胚葉系細胞、栄養膜幹細胞、それぞれについて、ヒストンの修飾をゲノムワイドに解析するため、対応する野生株細胞とともに、ChIP-chip法による解析を行った。ヒストンの修飾としては、ヒストンH3 lysine 4残基のジメチル化(H3K4me2)、lysine 27残基のトリメチル化(H3K27me3)、lysine 9残基のジメチル化(H3K9me2)修飾の3種類の修飾についての解析を行った。また、同時に、遺伝子発現プロファイルについてもマイクロアレイにより取得した。
- (4) ES細胞及びFlk1陽性の中胚葉系細胞については、薬剤によりGata4遺伝子の発現を誘導できる系を用いることで、Gata4に対する応答性がDNAメチル化酵素欠損細胞と野生株細胞でどのように異なるかを明らかにするため、経時的な遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより取得した。
- (5) 上記により取得した多数のゲノムワイドな遺伝子発現データ、ヒストン修飾データは、データベース化を行うことで管理した。
- (6) 多数のデータについて、比較解析、相関

解析を効率良く行えるように、Web インタフェースによる解析システムの開発を行った。

#### 4. 研究成果

本研究課題開始当初は、微量のゲノム DNA からゲノムワイドに DNA メチル化状態を解析する実験手法の開発を目指したが、他グループによりマウス胚における DNA メチル化解析が先行して行われていることが明らかになったこと、研究代表者が参加した研究により細胞核移植による DNA メチル化酵素欠損栄養膜幹細胞を樹立できたこと、DNA メチル化酵素欠損 ES 細胞を効率よく中胚葉系細胞に分化する系を確立できたことから、分化段階の異なる複数の DNA メチル化酵素欠損細胞を用い、申請時の最終段階に想定していたゲノムワイドなヒストン解析及び遺伝子発現解析を行うことで、エビジェネティックな遺伝子発現制御ネットワークのシステムの解析を行った。その結果、以下の研究成果が得られた。

- (1) 細胞核移植により樹立した DNA メチル化酵素欠損栄養膜幹細胞について遺伝子発現プロファイルの解析を行うことで、①細胞核移植を行い樹立した栄養膜幹細胞 (ntTS WT) は、細胞核移植を行っていない栄養膜幹細胞 (TS) と近い発現プロファイルを示す、②DNA メチル化酵素欠損 ES 細胞の核を用いて細胞核移植を行い樹立した栄養膜幹細胞 (ntTS KO) についても、ntTS WT および TS と近い発現プロファイルを示すことを明らかにした (図 1) (Sakaue, M., Ohta, H., et al., Current Biology, 2010)。このことは、胚胎外系の細胞である栄養膜幹細胞においては、細胞の発現プロファイルに対する DNA メチル化の寄与が比較的小さいことを意味する重要な結果である。

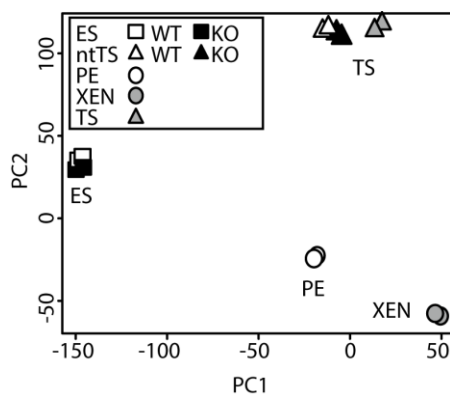


図 1 遺伝子発現プロファイルの主成分分析

- (2) Flk1 陽性の中胚葉系細胞において Gata4 遺伝子の発現を誘導した際に、DNA メチル化酵素欠損細胞と野生株細胞における転写因子 Gata4 に対する応答について、遺伝子発現プロファイルを経時的に取得し解析することで、①DNA メチル化酵素を欠損した中胚葉系細胞において Gata4 に応答する遺伝子は Group1 と Group2 の 2 つのグループに分けられること、② Group1 の遺伝子群は ES においては DNA メチル化酵素の欠損細胞、または野生株細胞のどちらでも Gata4 に応答するが、中胚葉系細胞では野生株細胞では Gata4 に応答しないこと、③ Group2 の遺伝子群は中胚葉系細胞においては、DNA メチル化酵素の欠損細胞、または野生株細胞のどちらの細胞でも Gata4 に応答するが、DNA メチル化酵素の欠損細胞では応答が早く、また、ES 細胞においては Gata4 に応答しないことを明らかにした (図 2)。

この結果は、DNA メチル化によって、転写因子に対する遺伝子発現の応答性が、細胞種類・分化状態によって異なり、また、応答のタイミングも DNA メチル化により影響を受けることを示唆した (Oda, M., Kumaki, Y., Shigeta, M., et al., PLOS Genetics, 2013)。このことは、DNA メチル化は個々の遺伝子の発現を制御しているのみならず、細胞の種類・状態に依存して遺伝子発現のネットワークを制御していることを示した画期的な成果である。

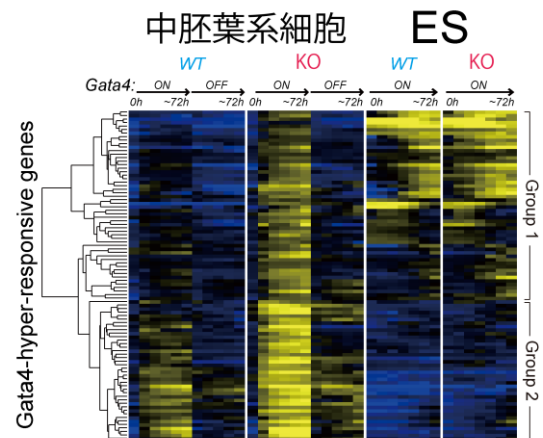


図 2 Gata4 応答遺伝子の経時的遺伝子発現の階層的クラスタリングによる解析

- (3) ES 細胞、中胚葉系細胞および細胞核移植栄養膜幹細胞の DNA メチル化酵素欠損細胞および野生株細胞について、遺伝子発現プロファイル及びヒストン修飾のゲノムワイドな解析を行った。その結果、DNA メチル化消失により発現が変化する遺伝子は細胞種類によって大きく異なり、また、重複が少ないことを明らかにした (図

3). また、遺伝子発現、ヒストン修飾状態のどちらについても、DNA メチル化の消失よりも主として細胞種の違いに依存するが、その中では H3K27me3 が最も DNA メチル化消失の影響を受けることを明らかにした (図 4) (Kumaki, Y., et al., 投稿準備中)。これらの結果は、DNA メチル化のエピジェネティックな遺伝子発現制御ネットワークにおける役割の一端を明らかにする重要な成果だと思われる。

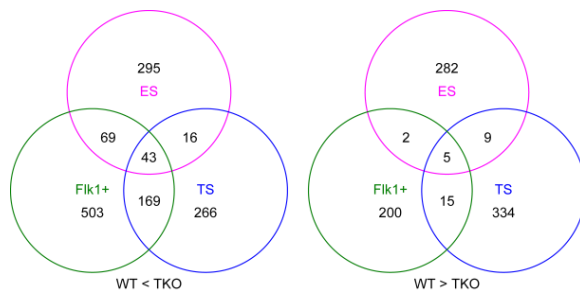


図 3 DNA メチル化酵素欠損細胞 (TKO) と野生株細胞 (WT) で発現が異なる遺伝子の数。ES 細胞、中胚葉系細胞 (Flk1+)、栄養膜幹細胞 (TS) の 3 種類の細胞間での重なりが少ない。

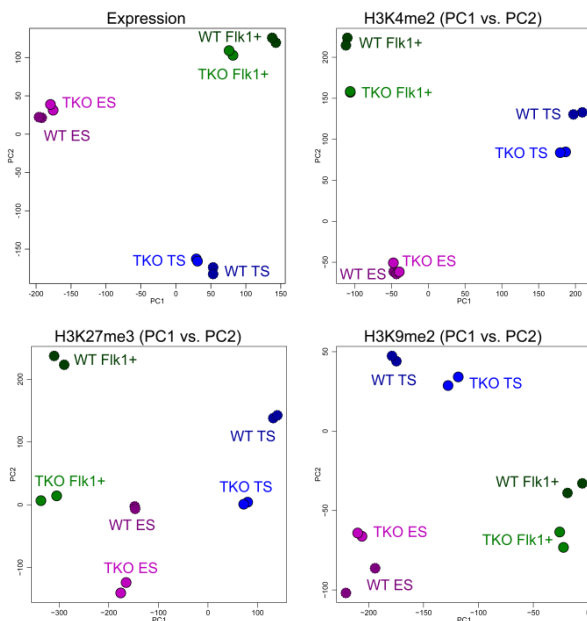


図 4 DNA メチル化酵素欠損細胞 (TKO) と野生株細胞 (WT) について、ES 細胞、中胚葉系細胞 (Flk1+)、栄養膜幹細胞 (TS) の 3 種類の細胞における遺伝子発現プロファイル及び H3K4me2, H3K27me3, H3K9me2 のヒストン修飾についての主成分分析

## 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)

- ① Masaaki Oda#, Yuichi Kumaki#, Masaki Shigeta#, Lars Martin Jakt, Chisa Matsuoka, Akiko Yamagiwa, Hitoshi Niwa and Masaki Okano (# equal contribution), DNA Methylation Restricts Lineage-Specific Functions of Transcription Factor Gata4 during Embryonic Stem Cell Differentiation. *PLOS Genetics*, 9, e1003574 (2013)、査読有、in press  
DOI:10.1371/journal.pgen.1003574
- ② Morito Sakaue#, Hiroshi Ohta#, Yuichi Kumaki, Masaaki Oda, Yuko Sakaide, Chisa Matsuoka, Akiko Yamagiwa, Hitoshi Niwa, Teruhiko Wakayama and Masaki Okano (# equal contribution), DNA Methylation Is Dispensable for the Growth and Survival of the Extraembryonic Lineages. *Current Biology*, 20, 1452-1457 (2010)、査読有  
DOI:10.1016/j.cub.2010.06.050

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yuichi Kumaki, Akiko Yamagiwa, Chisa Matsuoka and Masaki Okano, Genome-wide analysis of histone modification in DNA methylation deficient cells、第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 27 日、札幌
- ② 熊木勇一、山際晶子、松岡智沙、岡野正樹、Dnmt 欠損細胞におけるヒストン修飾の ChIP-chip 法による解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 8・9 日、神戸
- ③ 熊木勇一、山際晶子、松岡智沙、岡野正樹、Dnmt 欠損細胞におけるヒストン修飾の ChIP-chip 法による解析、第 4 回エピジェネティクス研究会年会、2010 年 5 月 28 日、米子

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊木 勇一 (KUMAKI YUICHI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：50455341

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し