

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710200

研究課題名（和文） 次世代シーケンサーによるDNA脱メチル化誘導法の検討：エピゲノム制御をめざして

研究課題名（英文） Studies on the induction methods of the DNA demethylation using next-generation sequencer

研究代表者

窪崎 敦隆 (KUBOSAKI ATSUTAKA)

独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発ユニット・研究員

研究者番号：30425673

研究成果の概要（和文）：

メチル化DNAを部位特異的に改変する為の基礎的技術および知見を得る為に、まずメチル化DNA認識蛋白質キャプチャー法と次世代シーケンサーを用いたMBD-seq法を確立した。さらに、DNA脱メチル化作用をモニター出来るMoCEVシステムを開発した。このシステムを用いることで、DNAメチル化阻害剤によるプロモーター領域のメチル化の変化を確認することに成功した。本研究で得られた知見は、DNAの修飾を部位特異的に改変する技術の確立に有用である。

研究成果の概要（英文）：

DNA methylation dynamically affects the expression of downstream genes. To obtain the fundamental technologies of site-specific changes of modified DNA, I first established the methylated DNA binding domain capture and next-generation sequencing (MBD-seq) and observed the DNA methylation status of human fibroblasts and monocytes. I also established a simple and flexible episomal vector-based method called MoCEV (Modified Cytosine in Episomal Vector) to monitor the status of cytosine modification of any desired DNA fragments. I observed enhanced expression of fluorescent marker protein controlled by DNA methylated promoter upon the treatment of 5-aza-2'-deoxycytidine in a dose dependent manner. I believe that the established methods and findings in this project may help to develop new methods of site-specific changes of modified DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：(1)メチル化DNA (2)次世代シーケンサー (3)MBD-Seq (4)DNA脱メチル化誘導 (5)エピソーマルベクター

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、DNA の塩基配列を認識して結合する転写制御因子が、結合部位の選択にエピゲノムの影響を大きく受けており、エピゲノムとの相互作用によって厳密に転写を制御していることを明らかにしていた。一方、これまでの様々な研究報告から、ガンや生活習慣病など多くの疾患でエピゲノムの異常、特に DNA メチル化の異常が起っていることが報告されており、研究対象としてメチル化 DNA に関心が集まってきていた。研究開始当初、DNA メチル化部位を大量に解析する方法として、メチル化された DNA を濃縮し、それらの DNA 断片をタイリングアレイで解析する方法が開発されていた。しかし、精度や網羅性の観点から濃縮した DNA 断片を次世代シーケンサーで解析する方法が、今後 DNA メチル化部位の主要な網羅解析法になると考え、本研究の解析に用いることを計画した。

DNA のメチル化によって転写制御因子の結合が阻害されると遺伝子の発現が抑制されると考えられている。つまり、任意の遺伝子の発現を誘導するには、その遺伝子の発現制御領域の脱メチル化を誘導し、転写制御因子が結合出来るようにする必要がある。この考え方に基づいて、任意の場所に対する人工的な脱メチル化誘導法の確立が求められており、その技法の応用としてガンなどの疾患に対する精度の高い治療法の開発が期待されていた。

一方、米国や欧州では、エピジェネティクス研究に関する大型プログラムが推進されており、この分野の研究が精力的に進められている。しかし、現段階では幹細胞や疾患発症機序と DNA メチル化の関係といったメチル化 DNA の状態に着目した解析が主流で、人工的な脱メチル化誘導法の基づいたエピゲノム制御法の確立に向けた基礎技術の確立に関する研究は、十分ではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、転写制御因子の結合認識やクロマチン構造などに大きな影響を与える DNA のメチル化修飾に着目し、メチル化 DNA を部位特異的に改変する為の基礎的技術および知見を得ることを目的とした。この目的を達成する為、(1) まず、DNA のメチル化修飾が全ゲノム上のどこで起しているかを明らかにする技術の開発を試みた。メチル化 DNA 認識蛋白質キャプチャー法 (Methylated DNA binding domain capture, MBD) に着目し、この方法で濃縮した DNA 断片を、イルミナ社の次世代シーケンサーである Solexa GIIx で解析する方法 (MBD-seq 法) を確立すること

にした。(2) 次に、確立出来た MBD-seq 法で得られたヒト繊維芽細胞とヒト単球細胞の全メチル化 DNA 領域の情報から、ヒト繊維芽細胞で有為の高メチル化を示した領域に着目した。この領域に関して、既知のエピゲノム改変剤である 7 種類の阻害剤を用い、繊維芽細胞に対する DNA 脱メチル化作用の有無を検討することにした。(3) エピゲノム改変剤を含む DNA 脱メチル化作用に関して、任意の配列に対する DNA メチル化状態をモニター出来る方法の開発を目的に、In-Fusion 法を用いることで PCR 産物を制限酵素処理なく直接エピソーマルベクターに組み入れる方法の開発を目指した。

3. 研究の方法

細胞および試薬： 正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (NB1RGB) は、RIKEN BioResource Center Cell Bank より分与を受け、37°C・5% CO₂ の条件のもと、10% FBS、1% penicillin/streptomycin を添加した MEM α (ライフテクノロジー社) で培養した。正常ヒト単球細胞は、(株) タカラバイオより購入した。本研究で用いたエピゲノム改変剤は、(株) 和光純薬工業より購入した。

MBD 法： ヒト繊維芽細胞およびヒト単球細胞のゲノム DNA は、FastPure DNA kit または NucleoSpin Tissue Kits を用いて単離した。単離したゲノム DNA のうち 1 μ g を Covaris S2 sample preparation instrument system (コバリス社) を用いて、200 bp 平均長で断片化した。メチル化 DNA 認識蛋白質キャプチャーは、MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit (ライフテクノロジー社) を用いた。

次世代シーケンサーによる塩基配列決定： イルミナ社推奨プロトコールに従い、濃縮した高メチル化 DNA 断片のシーケンスライブラリを作製した。作製したライブラリは、QIAquick MinElute PCR purification kit (キアゲン社) で精製後、DNA 1000 Labchip of 2100 bioanalyzer (アジレント社) で定量し、Solexa GIIx (イルミナ社) で塩基決定を行った。

Methylation Specific PCR (MSP) 法： ヒト繊維芽細胞とヒト単球細胞のメチル化 DNA 領域の解析結果から、単球細胞で特異的に DNA 脱メチル化している領域 30 カ所を選び、MSP プライマーを設計した。既知のエピゲノム改変剤である 7 種類の阻害剤 (トリコスタチン A、バルプロ酸、デキサメタゾン、ヒドロキサミン酸サブエロイルアニリド、ゼブラリン、

RG108、5-アザ-2'-デオキシシチジン (5-aza) で処理した、ヒト繊維芽細胞からゲノム DNA を単離した。EZ DNA Methylation-Gold kit を用いて、単離したゲノム DNA をバイサルファイト処理し、その後回収した DNA を用いて、DNA メチル化量を ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems 社) で測定した。

Modified Cytosine in Episomal

Vector (MoCEV) システム： エピソーマルベクター pEBMulti-Hyg は、(株) 和光純薬工業より、In-Fusion HD cloning kit はタカラバイオ社より購入した。pEBMulti-Hyg にレポーター遺伝子としての Venus を導入し、その発現調整配列である CAG プロモーターを欠損させた pEBMulti-Hyg/Venus+/Promoterless を作製した (図 1)。SPI1 制限酵素切断後、任意の配列および修飾を持つ DNA 断片を In-Fusion 法で組み込み、その反応物を直接培養細胞に導入した。

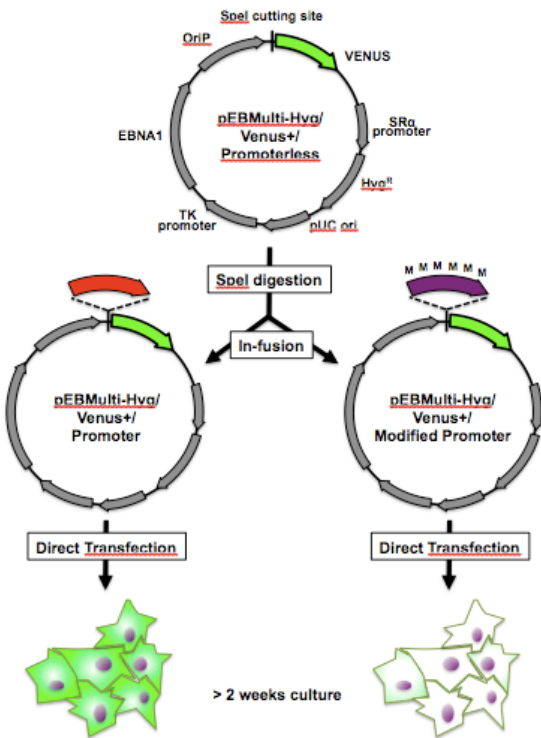


図1 MoCEVの作業流れ図

4. 研究成果

本研究期間において、以下の成果を挙げることが出来た。

(1) MBD 法で濃縮した DNA 断片を、次世代シーケンサーであるイルミナ社の Solexa GIIx を用いることで解析する MBD-seq 法の確立に成功した。本方法を用いることで、ヒト

繊維芽細胞やヒト単球細胞などを用いて全ゲノム領域における DNA メチル化状態に関する結果を得ることが出来た。これらの結果を、過去の報告でヒト繊維芽細胞とヒト単球細胞で DNA メチル化の程度が異なることが報告されている、転写因子 PU.1 遺伝子のプロモーター領域について確認してみたところ、期待された通り、有為な違いを見いだすことに成功した。そこで、全ゲノム領域で解析してみたところ、多くの新規組織特異的 DNA メチル化領域を見いだした (図 2A)。それらの領域のうち、プロモーター領域に違いがある遺伝子について、公共の遺伝子発現データベースと比較すると、例えば、図 2A で示した遺伝子においては、免疫系細胞系譜の細胞にのみ遺伝子発現が認められた (図 B)。このことは、この遺伝子が細胞系譜特異的に遺伝子の発現を DNA のメチル化によって制御していることを強く示している。加えて、蛋白質コード遺伝子のプロモーター領域だけではなく、ノンコーディング RNA の発現調節を行っている可能性を示す結果が得られ、メチル化 DNA を部位特異的に改変する為に重要な知見が得られた。

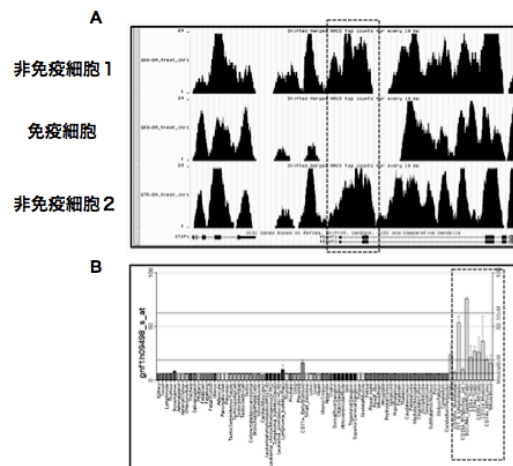


図2 MBD-Seqの結果の例

(2) MBD-seq で得られたヒト繊維芽細胞とヒト単球細胞のメチル化 DNA 領域の解析結果から、単球細胞で特異的に DNA 脱メチル化している領域 30 カ所を選び、阻害剤で処理をした繊維芽細胞でそれらの領域に DNA 脱メチル化変化が起きているかを MSP 法で検討した。その結果、5-aza が最も多くの領域において DNA 脱メチル化を誘導出来ることが明らかになった。

(3) 任意の領域の DNA メチル化が、近傍の遺伝子発現に対する影響を検証する新規の実験手法が必要であると考え、エピソーマルベクターを改変した新規解析手法 MoCEV を開発した。この方法が有効であることを示す為に、レポーター遺伝子としての Venus と強い発現を誘導する CAG プロモーターを用い、

293T 細胞で実験を行った。CAG プロモーターに酵素的にメチル化修飾を加え、哺乳動物細胞発現ベクターを *in vitro* で再構築し、293T 細胞への導入実験を行ったところ、下流の Venus 遺伝子の発現が抑制されることが観察された (図 3)。さらに、この状態は細胞の培養を続けても持続することが示された (図 4)。さらに、先の実験で選ばれた 5-aza で処理をすると Venus の発現誘導が観察されたことから、任意の領域の DNA メチル化領域に対する脱メチル化誘導を観察する為の新規技術の作製に成功したと結論づけた。現在、これらの成果は国際誌での発表のため投稿中である。

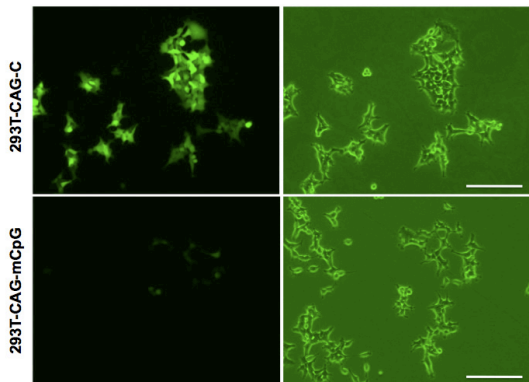


図3 MoCEVを導入した細胞

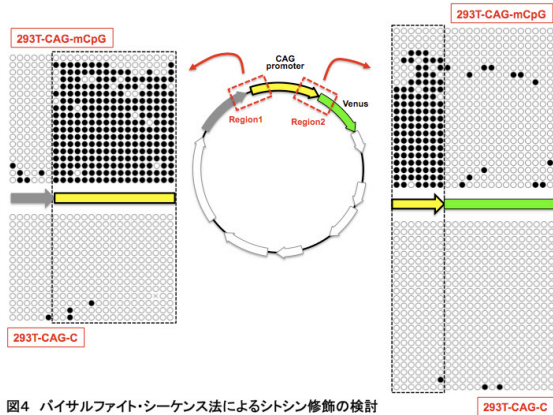


図4 バイサルファイト・シーケンス法によるシトシン修飾の検出

Meeting, 20th-25th February, 2011, Yokohama, Kanagawa, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者
窪崎 敦隆 (KUBOSAKI ATSUTAKA)
独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発ユニット・研究員
研究者番号：30425673

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

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 1 件)

① Kubosaki, A., Simon, C., Suzuki, T., Shin, J., Hasegawa, Y., Suzuki, H.: WP7 Activity: Experimental Validation by Epigenetic Markers. FANTOM5 Ume Blossom