

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249019

研究課題名(和文) ヒトのエピゲノムの成立基盤

研究課題名(英文) The mechanistic basis of human epigenome establishment

研究代表者

佐々木 裕之 (SASAKI, Hiroyuki)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30183825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,200,000円、(間接経費) 11,160,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの細胞のDNAメチル化パターンを決める新規因子を同定し、メチル化が遺伝子の働きを調節する基盤を明らかにすることを目的とした。まず、DNAメチル化異常を伴う遺伝性免疫不全症の解析からZBTB24蛋白質を候補因子として同定し、遺伝子改変マウスを作成してこれがメチル化を調節することを証明した。また、ヒトとチンパンジーのメチル化比較により、CTCFという転写調節蛋白質、それが結合するDNA配列、及び直列型反復配列の塩基置換等の変化がメチル化パターンを決めることを明らかにした。以上の成果は、ヒトの進化、多様性、がん等の疾病の基盤の解明に役立つ。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify factors that determine DNA methylation patterns of human cells, with a long-term goal of clarifying mechanisms regulating gene expression. First, we identified ZBTB24 protein as a novel methylation pattern determinant, based on the study of an immune-deficiency syndrome accompanied by DNA hypomethylation at certain DNA sequences. A gene knockout study in mice confirmed that it is indeed a factor regulating DNA methylation. Second, based on the comparative study of methylation patterns between human and chimpanzee, we identified CTCF protein, a transcription factor, and its target sequence as methylation determinants. Species-specific sequence changes that disrupted CTCF binding were correlated with hypermethylation. Lastly, we identified CpG dinucleotide density in tandem repetitive sequences as another determinant. Our results provide a basis to study the roles of methylation in evolution, variability and disease such as cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人類遺伝学

キーワード：遺伝学 エピゲノム DNAメチル化 小分子RNA

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化やヒストン蛋白質の化学修飾に代表されるエピジェネティック修飾は、重要な遺伝子発現制御機構のひとつである。ヒトの身体は少なくとも200種類の細胞から成るが、それらの細胞種は各々特有のエピジェネティック修飾のパターン(エピゲノム)を持つ。一方、がんをはじめとする様々な疾患においてエピジェネティック修飾の異常が明らかになったほか、進化や種分化、及び種内の多様性や個体差におけるエピジェネティクスの役割も注目されてきた。しかし、エピジェネティック修飾の制御機構については未だ不明な点が多い。

DNA メチル化はエピジェネティック修飾の代表であり、DNA メチル化酵素(DNMT)によって触媒される。しかし、この酵素はCpG二塩基配列を認識するという特性以外に明らかな基質特異性を持たないため、標的特異性に関わる別の制御因子が存在するはずである。そのような因子として、DNMTと直接又は間接に相互作用する核内の蛋白質が考えられる。ここではそのような因子をトランスの因子と呼ぶ。一方、疾患感受性、個体差、進化のもとになるエピジェネティック多様性には、純粋にエピジェネティックな多様性と、標的領域の遺伝的な変化(塩基配列多型)に基づく多様性があるはずである。このようなエピジェネティック修飾の多様性をもたらす要因をシスの因子と呼ぶことにする。エピジェネティック修飾の制御機構を明らかにするためには、これらトランスとシスの因子を同定することが必要である。

2. 研究の目的

エピジェネティック修飾による遺伝子発現制御の基盤を明らかにするため、ヒトの正常・異常のDNAメチル化パターンの確立に寄与するトランスおよびシスの因子を同定する。そのため、以下の3つを具体的な目標として掲げて研究を行う。

(1) 免疫不全を特徴とする先天性メチル化異常症 ICF (immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies) 症候群の症例のゲノムをリシーケンスし、DNAメチル化酵素と相互作用してメチル化パターンを形成する新奇因子を同定する。1型 ICF 症候群は DNAメチル化酵素 DNMT3B の変異に起因することが分かっているが、この遺伝子に異常のない2型 ICF 症候群症例を解析すれば、そのような因子を捉えることができる可能性があると考えた。

(2) がんのメチル化異常に miRNA 以外の小分子 RNA が関与する可能性を探る。即ち、生殖細胞で特異的に発現する piRNA (PIWI interacting RNA) はレトロトランスポゾン配列の DNAメチル化を誘導することが知られている。我々は、PIWI ファミリー蛋白質(piRNAの生成や機能に関わる)がんで高

発現していることを見つけ、これをもとに piRNA ががん抑制遺伝子等の異常な高メチル化を導入するトランス因子となりうるのではないかと考えた。

(3) ヒト・チンパンジーのエピゲノム(DNAメチル化)比較を行い、再現性よくメチル化パターンの違いを呈するゲノム領域を同定し、メチル化の違いに寄与する配列変化(シスの因子)を検索・同定する。ヒトとチンパンジーのゲノム配列は98%以上の一致率であるため、メチル化の違いに寄与する塩基置換等を効率よく同定できると期待される。

以上により、DNAメチル化パターンの制御に寄与する新規のトランス因子とシス因子を同定し、それらの結果を総合してヒトのエピゲノムの成立基盤について考察する。

3. 研究の方法

「2. 研究の目的」に掲げた3つの目標・テーマについて、それぞれ以下の方法で研究を進める。

(1) DNMT3B 遺伝子に変異のない2型 ICF 症候群の国内症例3例と海外症例5例について、末梢白血球からゲノムDNAを抽出し、エキソキャプチャー法により全遺伝子のエキソ断片を濃縮する。得られた断片を適度に増幅し、次世代シーケンサーで塩基配列を解読する(エキソーム解析)。パイオインフォマティクスの手法により多型を排除した後、遺伝子の機能喪失が予想される共通変異を同定する。同定した遺伝子がメチル化を制御することを確定するため、機能解析を行う。

(2) 予備的実験では、本来生殖細胞特異的に発現する PIWI ファミリー蛋白質が幾つかの消化管由来がん細胞株で検出された。胃がんでは印環細胞がんが発現が高かった。よって、5つの細胞株で網羅的な小分子RNAの分離とシーケンス解析を行い、piRNAが存在するか、またそれらの配列がメチル化されているゲノム領域と一致するか調べる。これにより、由来する領域、前駆体RNA、標的遺伝子等を推定する。

(3) ヒト成人女性4個体、チンパンジー成体雌4個体の末梢白血球ゲノムDNAを各々プールし、MBD(メチルCpG結合ドメイン)-GST融合蛋白質を用いてメチル化されたゲノムDNA領域を濃縮する。濃縮したDNA断片を21・22番染色体に限定したマイクロアレイで解析し(MBD-Chip) ヒト・チンパンジー間で明らかにメチル化レベルの異なる領域を拾い出す。同定された全ての領域についてゲノム構造を調べ、共通なシス(配列)の特徴があるかどうか明らかにする。近傍に遺伝子がある場合には、ヒト・チンパンジー間で発現レベルに差がないか定量PCR法で調べる。

4. 研究成果

3年間の研究により、以下の成果を得た。

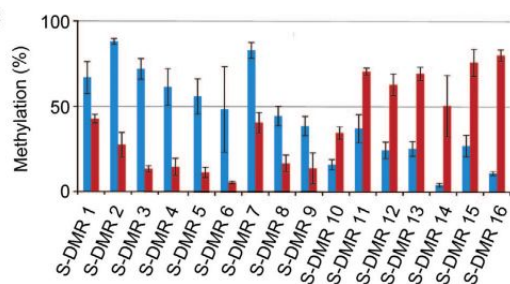
(1) 2型 ICF 症候群 4 例についてエクソーム解析を行ったところ、2 例において ZBTB24 (BTB ドメインと亜鉛フィンガーを有する機能未知の蛋白質) 遺伝子にホモ接合型の機能喪失変異 (2 種類) が見つかった。ほぼ同時にオランダの研究者らが 2 型 ICF 症候群における ZBTB24 遺伝子の変異を報告したが、奇しくもそのうちのひとつは我々が発見した変異と同一であった (de Greef et al., 2011)。一方、海外の共同研究者より入手した未解析の 2 型 ICF 症例を検索したところ、海外の症例一例で新たに 2 つの変異を同定できた (複合ヘテロ接合体)。これら 2 型 ICF 症候群で発見した新規 ZBTB24 変異について、論文にまとめて発表した (Nitta et al., 2013) (表)。

症例	接合性	変異
1 (国内)	ホモ	K263X (ナンセンス)
2 (国内)	ホモ	C383Y (アミノ酸置換)
3 (海外)	複合ヘテロ	R320X (ナンセンス) C327W fsX54 (フレームシフト)

ZBTB24 蛋白質が DNA メチル化に関わることを証明するため、ZBTB24 ノックアウトマウスを作成した。2 型 ICF 症候群では動原体領域のサテライト配列が低メチル化となることが知られているが、ノックアウトマウスでは卵黄嚢においてサテライト配列の低メチル化が見られた。よって、この蛋白質がメチル化導入のトランス因子であることを確定することができた (投稿準備中)。

(2) PIWI ファミリー蛋白質が高発現しており、かつメチル化異常を示す胃がん、大腸がんの細胞株 5 つを選び、小分子 RNA の網羅的なシーケンス解析を行った。その結果、これらの細胞株において piRNA は高発現しておらず、小分子 RNA の大部分は miRNA であることが分かった。そこで、同様に乳がんの 2 細胞株で解析を行ったが、やはり piRNA は同定できなかった。これから、例え PIWI ファミリー蛋白質が高発現していても、がんにおいて piRNA は必ずしもメチル化異常と関係しないことが分かった (未発表)。しかし、がんと piRNA の関係を否定する証拠はなく、引き続き検討する必要がある。

(3) ヒト・チンパンジーのメチル化の違いを同定するため、ヒト成人女性 4 個体、チンパンジー成体雌 4 個体の末梢血白血球 DNA をプールし、MeDIP-Chip 法で解析した。その結果、21 番、22 番染色体において合計 16 領域においてメチル化の違いを同定した (図)。



(S-DMR (species-specific differentially methylated region) 1~16; 青がヒトのメチル化レベル、赤がチンパンジーのメチル化レベルを示す)。それらの多くは遺伝子の近傍にあり、メチル化の違いが遺伝子発現レベルと相関している例が少なくともひとつ (NM1 遺伝子)。メチル化の違いが選択的スプランシングと相関する例がひとつ見つかった (APP 遺伝子)。さらに、種間メチル化差異の多くが CTCF (亜鉛フィンガーを有する転写調節蛋白質) の結合配列の塩基の違いに起因することが明らかになり、メチル化状態を決める新たなトランス因子 (CTCF 蛋白質) とシス因子 (その結合配列) が明らかになった。また、直列型反復配列内の塩基置換 (特に CpG 二塩基配列に影響するもの) に起因する DNA メチル化変化もあることを明らかにした (Fukuda et al., 2013)。

以上により、ヒトの細胞のメチル化パターンを決定する 2 つ新規トランス因子 (ZBTB24 及び CTCF) と 2 つの新規シス因子 (CTCF 結合配列及び直列型反復配列) を同定し、当初の目的を達成した。即ち、ヒトの細胞のエピゲノムは複数のトランス因子とシス因子から成るネットワークにより制御されることが明らかになった。

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 3 件)

1. Nitta, H., Unoki, M., Ichiyanagi, K., Kosho, T., Shigemura, T., Takahashi, H., Velasco, G., Francastel, C., Picard, C., Kubota, T. & Sasaki, H. Three novel ZBTB24 mutations identified in Japanese and Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. *J. Hum. Genet.* 58, 455-460 (2013) 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2013.56
2. Fukuda, K., Ichiyanagi, K., Yamada, Y., Go, Y., Udono, T., Wada, S., Maeda, T., Soejima, H., Saitou, N., Ito, T. & Sasaki, H. Regional DNA methylation differences between humans and chimpanzees are associated with genetic changes, transcriptional divergence and disease genes. *J. Hum. Genet.* 58, 446-454 (2013) 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2013.55
3. Tomizawa, S. & Sasaki, H. Genomic imprinting and its relevance to congenital disease, infertility, molar pregnancy and induced pluripotent stem cells *J. Hum. Genet.* 57, 84-91 (2012) 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2011.151

〔学会発表〕(計 10件)

1. 佐々木裕之．エピゲノムとヒトの発生・生殖，日本人類遺伝学会第 58 回大会，2013.11.21-22，仙台
2. 新田洋久，鶴木元香，一柳健司，古庄知己，重村倫成，高橋浩士，Guillaume Velasco，Claire Francastel，Capucine Picard，大津真，金子新，久保田健夫，佐々木裕之．2 型 ICF 症候群原因遺伝子 ZBTB24 の DNA メチル化制御機構の解明，日本人類遺伝学会第 58 回大会，2013.11.21-22，仙台
3. 佐々木裕之．エピジェネティクスと生体恒常性維持，日本体質医学会，2013.10.5，久留米
4. 福田溪，一柳健司，井口志洋，佐々木裕之．トランスポゾンによる霊長類エピゲノムの進化，日本遺伝学会第 85 回大会ワークショップ「転写因子と宿主の相互作用」，2013.9.19-21，横浜
5. 佐々木裕之．ヒトの進化と病気にエピゲノム，日本人類遺伝学会第 57 回大会，2012.10.24-27，東京
6. 新田洋久，久保田健夫，古庄知己，高橋浩士，佐々木裕之．2 型 ICF 症候群の原因遺伝子候補 ZBTB24 の機能解析，日本人類遺伝学会第 57 回大会，2012.10.24-27，東京
7. Sasaki, H. Identification of DNA methylation differences correlated with transcriptional divergence between humans and chimpanzees in chromosomes 21 and 22. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases/The 7th Annual Conference of Asian Epigenome Alliance, 2012.4.19-22, Shanghai, China
8. 佐々木裕之．DNA メチル化と小分子 RNA の網羅的解析がもたらす新発見，第 34 回日本分子生物学会年会バイオテクノロジーセミナー，2011.12.13-16，横浜
9. 新田洋久，久保田健夫，古庄知己，高橋浩士，佐々木裕之．エキソーム解析による 2 型 ICF 症候群の原因遺伝子探索，日本人類遺伝学会第 56 回大会，2011.11.9-12，千葉
10. 福田溪．霊長類間の DNA メチル化多型の解析，日本遺伝学会第 83 回大会，2011.9.20-23，京都

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木裕之 (SASAKI, Hiroyuki)

九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：30183825

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

一柳健司 (ICHIYANAGI, Kenji)

九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：70401560