

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310130

研究課題名(和文)5ヒドロキシメチルシトシンの解析：ゲノムワイドマッピングと結合タンパク質の探索

研究課題名(英文)Analysis of 5-hydroxymethylcytosine: genome-wide mapping and screening for binding proteins

研究代表者

伊藤 隆司 (ITO, Takashi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90201326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円

研究成果の概要(和文)：生物は、同一のゲノム配列を様々に読み分けることによって、多様な細胞を創り出しています。そのための仕組みのひとつとして、ヒトをはじめ様々な生物は、ゲノムの中の特定の場所にあるシトシンという文字に化学的にマークを付けるメチル化を利用しています。最近の研究によって、生物はヒドロキシメチル化というマークも利用されていることが分かりました。そこで、この研究ではヒドロキシメチル化のマークがゲノム中のどこに付けられているか、それを明らかにする新しい方法を開発しました。

研究成果の概要(英文)：Living organism reads the same genome sequence variably to create a variety of cell types. To read the same genome differentially, many organisms including human exploits a mechanism termed methylation, which chemically marks the genomic letter called "cytosine" located in particular locations in the genome. Recent studies revealed that the organisms also use hydroxymethylation to mark their genomes. In this study, we developed methods to reveal the positions of hydroxymethylation in the genome.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：5ヒドロキシメチルシトシン

1. 研究開始当初の背景

真核生物ゲノム DNA 中の修飾塩基としては、シトシン(C)の5位炭素原子がメチル化されて生じる5メチルシトシン(5mC)が古くより知られ研究が進んでいた。特に哺乳類においては、DNAメチルトランスフェラーゼ3(DNMT3)による「書き込み」機構、DNMT1による「維持複製」機構、そしてメチル化DNA結合タンパク質による「読み取り」機構についての理解が、分子レベルと個体レベルの双方で大きく進展した。更に次世代シーケンス技術の登場により、5mCの分布をゲノム全体にわたって一塩基解像度で把握することも可能になった。その反面、「消去」機構としてのDNA脱メチル化に関しては、未だに議論が絶えず不明の部分が多く残されたままになっていた。

2009年、哺乳類ゲノム中の新しい修飾塩基として5ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)の存在が明らかにされた。5hmCは5mCの酸化によっても生じるが、例えばPurkinje細胞ではその含量は5mCの40%にも及び、単なる酸化障害による分解産物とは考えにくい。実際に、5hmCは2オキソグルタル酸およびFe(II)を要求するオキシゲナーゼの一種であるTetによって5mCから生成されることが示された。更にTet1を胚性幹細胞でノックダウンすると、Nanogプロモータの低メチル化状態を維持できず、幹細胞性が失われることも報告された。

ここで注意したいのは、5mCを複製時に維持するDNMT1が5hmCを認識しないことである。つまり、5mCが5hmCに変換されると次の複製では維持されず、娘細胞にはCとして伝えられる。したがって、5hmCは脱メチル化の中間段階であって、上記のNanogプロモータの低メチル化状態もTet1と5hmCを介する脱メチル化機構によって維持されている可能性も考えられる。また、メチル化DNAを認識するMBDタンパク質が5hmCを認識しないことは、細胞が両者を峻別していることを示すと同時に、5hmCへの変換が機能的には脱メチル化と同義である可能性も示唆する。このように、5hmCはDNA脱メチル化との関連からも大いに注目集めた。

2. 研究の目的

上記のような状況の下、5hmCのゲノム内分布を探るべく、その網羅的検出法の検討が始まった。5mCの位置を同定する際のゴールドスタンダードであるバイサルファイトシーケンス法では、5mCと5hmCを識別できないことが示された。これはバイサルファイトを利用して得られたメチロームデータの解釈にも影響を及ぼす重要な知見である。また、5hmC特異的抗体の作製も進められているが、抗体で免疫沈降したDNA断片をシーケンスする方法には2つの限界がある。第一の限界は、5mCの研究で示されてきたように、対象となる修飾塩基が集中する領域以外の検出が困

難な点である。5hmCの場合、その含量は一般に5mCよりも少ないので、困難はより一層であろう。第二の限界は、得られた配列中のどのCがヒドロキシメチル化されているのかを特定できない点である。つまり、このアプローチには感度と解像度の双方に限界があるために、新しい方法の開発が求められたが、有力な方法は報告されていなかった。我々は、5mCの位置を一塩基解像度で全ゲノムに亘って決定する全ゲノムバイサルファイトシーケンス法(Whole Genome Bisulfite Sequencing; WGBS)に関して、世界最高感度の技術Post-Bisulfite Adaptor Tagging(PBAT)を開発した実績があり、その経験を活かして5hmCの位置を一塩基解像度で決定する新しい方法を開発することを目的とした。

一方、5hmCの「書き込み」機構に関しては、既にそれを実行する酵素Tet1およびそのホモログTet2、Tet3が同定されている。しかしながら、5mCを認識するMBDタンパク質が5hmCを認識しないことから、5hmCは5mCとは異なるエピジェネティックマークとして機能すると考えられるにも関わらず、その「読み取り」機構の解明に関してはまだ何の端緒も得られていなかった。この問題に対して我々は、メチル化DNA結合タンパク質を検出・スクリーニングする独自の酵母1ハイブリッドシステムを開発した実績を活かして、ヒドロキシメチル化DNA結合タンパク質を探索するシステムの開発を試みることにした。

3. 研究の方法

項目1: 5hmCマッピング技術の開発

以下に述べる酵素を用いる方法および酸化剤を用いる方法を考案して、条件の検討を進めた。当初は(1)と(2)を計画したが、その後の研究情勢の急速な展開に鑑みて、項目1に集中して注力することとして、新たに(3)~(5)についても検討を加えた。

(1) MspJI-Seq

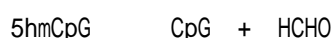
制限酵素MspJIは5mC(N₆/N₁₃₋₁₄)という認識切断様式を示す。したがって、ゲノムDNAを消化すると、YNCGR配列のうちCpGがメチル化されている部位からは、そのCpGを中心とする32~34ntの断片(MspJIタグ)が切り出される。MspJIタグの配列を次世代シーケンスで網羅的に決定して、ゲノムにマップするとメチル化CpGの位置を特定できる。さて、MspJIは、認識配列中の5mCが5hmCに変換されても活性を示すが、5hmCがグルコース化された5-glucosyl-hmC(5ghmC)に変換されると活性を示さない。この変換は、T4ファージの-glycosyltransferase(GT)によって触媒できる。そこで、この性質を利用して、以下に述べる方法で5hmCの位置のゲノムワイドな特定を試みた(MspJI-Seq)。

まず、ゲノムDNAをCpGメチラーズM.SssI

と GT で処理する。これを MspJI で消化して MJ タグを除去すると、残った高分子側 DNA 画分には 5ghmCpG のみが残る。2 サイクルのランダムプライミングでこの画分に対する 2 本鎖相補性 DNA を合成すると、5ghmCpG が CpG に戻った DNA が得られる。この DNA を M.SssI 処理して CpG を 5mCpG に変換し MspJI-Seq に供すると、元来の 5hmCpG 部位のみがタグとして回収される。

(2)M.SssI による脱ヒドロキシメチル化に基づく differential WGBS 法

細菌由来のメチレーズである M.SssI や M.HhaI をメチル基ドナーである SAM 非存在下で 5hmCpG を含む DNA に作用させると、下記の反応で 5hmCpG から HCHO が奪われて CpG が生成される。



一方、5mCpG や CpG には何の影響も及ぼさない。したがって、M.SssI 処理の有無で WGBS データを比較すると(differential WGBS)、M.SssI 処理によって脱メチル化が亢進した部位として 5hmCpG 部位を捉えることが可能になる。

(3)W-Seq

岡本らによって見出されたタングステン (W) 酸化物によって 5hmC を 5hmU グリコールに変化する反応を利用すれば、5hmC を C から T に変換された部位として読み出すことが可能である。

(4)oxBS-Seq

5hmC を化学的に酸化すると 5fC 更に 5caC へと変換される。5hmC はバイサルファイト処理によって変換されないため 5mC と識別が出来ないが、5fC や 5caC は変換されて T として読み出されるために、5mC との識別が可能である。つまり通常の WGBS の結果を酸化剤処理 DNA に対する WGBS の結果と比較することによって、5hmC の位置と修飾率を求めることが可能になる。この手法は、当初、ルテニウム (Ru) を酸化剤として用いる方法として報告された。そこでこの変換反応を追試して、我々独自の高感度 WGBS 技術である PBAT 法と組み合わせることを試みた。

更に Ru よりも DNA 損傷の少ない酸化剤として我が国で開発された AZADO を用いても検討を進めた。

(5)TAB-Seq (Tet-Assisted Bisulfite-Seq)

GT 処理によって 5hmC をグルコシル化した後に Tet を作用させて 5mC を 5fC や 5caC にまで酸化してから、バイサルファイトシーケンスを行うと、5hmC のみが C として出力される。これを通常の WGBS の結果と比較することによって、5hmC の位置と修飾率を求めることが可能になる方法が報告されたので、こ

れを PBTA 法と組み合わせることを検討することにした。

上記の(1)~(5)について、合成モデルオリゴヌクレオチドを用いた条件の最適化を進めた。そこで有効性を認めたものについては、実際のゲノム DNA への応用を図った。

項目 2 : ヒドロキシメチル化 DNA 結合タンパク質の 1 ハイブリッドスクリーニング

我々は、LexA オペレータと LexA の相互作用を利用してリクルートした CpG メチレーズ M.SssI によってベイト配列をメチル化し、メチル化 DNA 結合タンパク質をスクリーンする独自の酵母 1 ハイブリッドシステムを開発した。そこで、この系にオキシゲナーゼ Tet1 を共発現させて、ベイト配列中の 5mCpG を 5hmCpG に変換することを試みる。つまり、哺乳類ゲノム中の生理的 5hmC 生成経路 de novo CpG メチレーズによる 5mCpG の生成と Tet1 オキシゲナーゼによる 5hmCpG への変換の酵母細胞内再現を目指す。

これに成功すれば、メチル化 DNA 結合タンパク質のスクリーニングと同様に、ヒドロキシメチル化 DNA 結合タンパク質のスクリーニングも可能になる。

4 . 研究成果

項目 1 : 5hmC マッピング技術の開発

(1) MspJI -Seq

MspJI を用いてゲノム DNA の切断実験を繰り返したが、明確な 32~34nt の断片(MspJI タグ)を安定して回収することが困難であった。活性化オリゴヌクレオチドと呼ばれる合成核酸の共存が要求されるなど、結果は安定しなかった。32~34nt の断片が観察された場合にそれらをクローン化して配列決定を行った。期待される結果としては、断片の中央部に YnCGnR 配列が出現することであったが、そのような断片は少数であった。この結果は、少なくとも我々が試みた条件下では、MspJI が期待された特異性を発揮してゲノム DNA を切断しなかったことを示していた。このように、通常の制限酵素よりも相当に利用しにくい酵素であることが明らかになったため、この方法の追求は断念することにした。

(2)M.SssI による脱ヒドロキシメチル化に基づく differential WGBS 法

HhaI 部位に 5hmC を含む合成モデルオリゴヌクレオチドを用意して、メチレーズ M.HhaI を SAM 非存在下で作用させた上で、脱ヒドロキシメチル化の度合いを HhaI 消化によって評価する実験を行った。その結果、脱ヒドロキシメチル化が起こることは確認できた。効率を上昇させるために、種々の検討を進めた結果、市販の M.HhaI は SAM を結合しているようで、それを消費させる必要があることが分かった。そこで非修飾 HhaI 部位を持つダミー基質に晒して、SAM を消費した後に、

本来の基質に作用させる等の工夫が必要であった。また、反応の平衡を脱ヒドロキシメチル化に傾けるために、生成物である HCHO を酵素的に破壊したり、透析で系から除去する等の工夫も行った。また、M. Sssl についても同様の実験を行った。しかしながら、実用に耐える効率での脱ヒドロキシメチル化を安定に行う条件の同定には至らず、このアプローチも断念することにした。

(3)W-Seq

合成モデルオリゴヌクレオチドをタングステン酸化物あるいはタングステン酸と過酸化水素水で処理することによって、5hmC の hmUg への変換を再現することに成功した。当初、hmUg の生成はピペリジンによる切断で検出しており、高い変換効率を得ていた。しかしながら、PCR 増幅後に塩基配列決定を行うと変換効率 (=C ではなく T と読まれるリードの率) は、切断アッセイによるものよりも低い値しか得られなかった。つまり未変換のものが優先的に増幅されている可能性が示唆された。この点を確認するために、蛍光プライマーを用いたプライマー伸長アッセイを行ったところ、タングステン酸化物処理したサンプルに関しては、伸長阻害産物の生成を認めた。その量は切断アッセイと相関しており、hmUg が通常の DNA 合成酵素による鎖伸長をブロックする可能性を示唆していた。

そこで市販の様々な酵素について、プライマー伸長アッセイを行ったところ、損傷乗り越え型酵素が最も優秀な成績を収めることが分かった。しかしながら、その効率は概ね 50%程度であり、これはピリミジン環に対して水酸基がどちらに配置されるかという異性体効果である可能性が示唆された。

いずれにせよ、高い変換率は得られるもののそれを実用に結びつけるには、hmUg を容易に乗り越える DNA 合成酵素が必要であることが判明した。チミングリコールを乗り越える酵素や通常の DNA 合成酵素の変異体などの利用が今後は必要になると考えられる。

(4)oxBS-Seq

KRuO₄ を酸化剤として用いる方法が報告されたので、その追試を行った。実際に合成モデルオリゴヌクレオチドにおける酸化が再現されて、原法の追試には成功した。しかしながら、DNA の量が激減すること、毎回の実験による安定な再現が難しいこと等々の実用上の問題点が浮上して、PBAT 法との組み合わせによる効率的な oxBS-Seq の確立には至らなかった。

そこで Ru よりも DNA を損傷しない酸化剤の利用を念頭に文献調査を行った結果、我が国で開発された酸化剤 AZADO を見い出した。AZADO およびその誘導体は、超高活性と立体障害の大きな第 2 級アルコールの酸化にも有効であり、アルコールの空気酸化反応も可能なものとして注目されている触媒である。

実際に合成モデルオリゴヌクレオチドに作用させたところ、5hmC を酸化できることが確認できた。そこで溶液の組成や反応時間など様々な条件に検討を加えて、実用に耐える条件の検索を行ってきたが、安定して高い酸化を実現できる条件には未だ至っておらず、継続的な検討が必要であると思われた。

(5)TAB-Seq

市販の GT と Tet1 を用いた TAB-Seq を行うにあたり、それぞれの酵素の変換効率をモニターできる合成モデルオリゴヌクレオチドを準備して、反応条件の検討を進めた。その結果、簡単な PCR-RFLP で変換をチェックすることが可能になった。また、次世代シーケンサで読み出し可能な系も確立された。

更に、5hmC は通常の 5mC よりも格段にレベルが低いことから、通常の WGBS よりも高い読み深度が必要とされることも少なくないことを勘案し、全ゲノムではなくハイブリダイゼーションでエンリッチした制御領域を対象とする標的ヒドロキシメチローム解析の系を確立することにした。そのための第一段階として、SureSelect Methyl-Seq プローブでエンリッチした DNA に PBAT を適用することで、高感度の標的メチローム解析技術を開発した。

その上で TAB-Seq にこれを応用するために、GT と Tet で処理した DNA を上記のアッセイで変換効率をチェックし、SureSelect Methyl-Seq プローブでエンリッチしてから、PBAT 法による BS-Seq を行う方法を試みた。一連の操作のための条件検討を重ねた上で、実際にマウス ES 細胞をモデルに標的 TAB-Seq のライブラリ作成を試みて成功した。1 μg 程度のゲノム DNA から PCR フリーでのライブラリ作成も可能であるため、1 塩基解像度ヒドロキシメチル化解析のための有効な手段になると期待される。

項目 2 : ヒドロキシメチル化 DNA 結合タンパク質の 1 ハイブリッドスクリーニング

産総研 BIRC の協力を得て完全長 cDNA クローンを整備入手して、1 ハイブリッドシステム構築の準備を整えたが、項目 1 に集中して項目 2 を一旦中断したために、発現系の構築は予定通りには進まなかった。

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)

Miura F, Enomoto Y, Dairiki R, Ito T. Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Res.* 40:e136, 2012. doi: 10.1093/nar/gks454
Ota K, Feng SY, Ito T.

Detecting protein-DNA interactions using a modified yeast one-hybrid system.
Methods Mol Biol. 1164:39-50, 2014.
doi: 10.1007/978-1-4939-0805-9_5
Miura F, Ito T.
Highly sensitive targeted methylome sequencing by post-bisulfite adaptor tagging.
DNA Res. 22, 13-8, 2015.
doi: 10.1093/dnares/dsu034

研究者番号：

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 1件)

三浦 史仁, 伊藤 隆司 ヒドロキシメチル化DNA解析法 イラストで徹底理解するエピジェネティクスキーワード事典(牛島俊和、眞貝洋一編) pp.268-274, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：9 0 2 0 1 3 2 6

(2) 研究分担者

太田一寿 (OTA, Kazuhisa)
長崎国際大学・薬学部・准教授
研究者番号：0 0 3 2 2 7 2 7

(3) 連携研究者

()