

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770273

研究課題名(和文)プロモータ領域のメチル化を利用した遺伝子発現制御の進化的な獲得

研究課題名(英文)Evolutionary utilization of DNA methylation for regulation of gene expression in primitive vertebrates

研究代表者

岡村 浩司(Okamura, Kohji)

独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・室長

研究者番号：80456194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトやマウスなどの哺乳類を用い、DNAメチル化の遺伝子発現制御における役割が詳細に研究されてきたものの、その知識は必ずしも生物一般には当てはまらない。無脊椎動物ではメチル化自体が失われている場合もあるが、トランスポゾンの抑制がよく知られており、脊椎動物においてはその機能が発現制御に利用されたと考えることが自然である。本研究ではそれら進化上の境界付近に位置する脊椎を持たない脊索動物であるカタユウレイボヤと軟骨から成る脊椎を持つヤツメウナギについて、網羅的なプロモータ配列決定とそれらのメチル化解析を行い、両種の比較から遺伝子発現制御機構が進化上どのように獲得されたかにを調べた。

研究成果の概要(英文)：Vertebrates and invertebrates differ not only in the possession of a backbone, but also in the regulation of gene expression. Unlike in mice and humans, DNA methylation is not considered to be crucial for gene transcription in invertebrates. Accordingly, some organisms including larvaceans, fruit flies, nematodes, and yeasts have lost the CpG methylation system, whereas many prokaryotes still retain it. In the present study, we focused on the lamprey and ascidian organisms regarded as evolutionary links between vertebrates and invertebrates and examined the genomic sequences of their promoters. Total RNA samples were extracted from whole embryos to cover many promoters, and their sequences were determined by RNA-seq. Genome-wide DNA methylation analysis was also performed at base resolution using the PBAT method for both species. As a result, two types of promoters were clearly characterized in terms of the use of DNA methylation for each transcriptional system.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：DNAメチル化 エピジェネティクス 遺伝子発現 原索動物 転写開始点 プロモータ CpGアイランド

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA メチル化の遺伝子発現制御における機能は動物界においてはマウスやヒトといった哺乳類でよく研究されてきたに過ぎず、魚類を含めた脊椎動物にまでおよそ当てはまることは確認されているものの、ホヤやウニなどの無脊椎動物では状況がかなり異なる。ヒトでは全ゲノム中約 70% の CpG サイトはメチル化を受けており、他の脊椎動物もそれに近いグローバルな DNA メチル化を受ける。一方、例えばカタユレイボヤでは、全ゲノムの約半分に相当する領域がメチル化を受けており、しかも、複数の遺伝子を含む数 kb から数百 kb におよぶ比較的長いメチル化、非メチル化領域が交互に混在することが示されている。このモザイク様のメチル化パターンは、よく知られたヒトゲノムのグローバルなパターンとは大きく異なり、発現制御との関わりは明確になっておらず、また、真菌など単純な真核生物でも示されているトランスポゾン抑制機能でさえ、ホヤにおいては疑問視されている。驚くべきことにオタマボヤではメチル基転移酵素が失われおり、DNA メチル化の機構そのものがないことも知られている。脊椎動物の原始的な特徴を残す無顎類(ヤツメウナギなど)と無脊椎動物(原索動物のホヤおよびナメクジウオと棘皮動物のウニ)を用いた広範囲なメチル化解析から、脊椎動物と無脊椎動物の間にこのパターンの大きな違いがあることが分かっており、以上のことから DNA メチル化を利用した巧妙な遺伝子発現制御は、進化上、脊椎動物が誕生したごく初期に起こったグローバルなメチル化パターンの変化とともに獲得されたと考えるのが自然である。これまでのエピジェネティクス研究は哺乳類を中心に進められてきたため、このような進化的観点から遺伝子発現制御を考察した研究は例がなかった。

2. 研究の目的

哺乳類においてよく調べられてきた DNA メチル化と遺伝子発現制御の関係は、硬骨魚類にまで同様に認められる。これらの動物ではメチル化の有無、あるいは CpG ジヌクレオチドの出現頻度から、プロモータ配列は CpG アイランド型と非 CpG アイランド型の 2 つのタイプに分けられる。一方、無脊椎動物におけるメチル化は遺伝子の時空間的発現制御には関与していないと考えられており、実際、最も脊椎動物に近い無脊椎動物であるホヤではプロモータ配列は上述した 2 分されるような特徴を持っておらず、CpG アイランド様配列も見られない。ナメクジウオやウニといった他の無脊椎動物においても同様である。このようなことから、プロモータ配列の特徴が DNA メチル化の発現制御における役割と深く関わっていることが示唆さ

れ、特徴が異なる 2 グループ間の境界付近に位置する動物種を調べることで、進化的な獲得、さらに遺伝子制御のための分子機構に関する知見を得ることができると考えられる。そこで本研究では、無脊椎動物としてカタユレイボヤを、また脊椎動物としてヤツメウナギを選び、網羅的なプロモータ配列決定を行い、それらの特徴をまとめた。さらにヒトの配列とも比較することで、両者の間に明確な違いが存在することを確かめた。

3. 研究の方法

多くの遺伝子をカバーするため、カタユレイボヤについては尾芽胚を選び、胚全体から RNA を抽出、オリゴキャッピング法と次世代シーケンサを組み合わせた TSS-seq 法によりプロモータ配列の決定を行った。36 塩基および 48 塩基の 2 種類のリード長のデータをそれぞれ 420 万リード、470 万リード取得し、トランススプライシングを考慮した上で KH アセンブリにそれぞれ SeqMap および BLAT を用いてマッピングした。

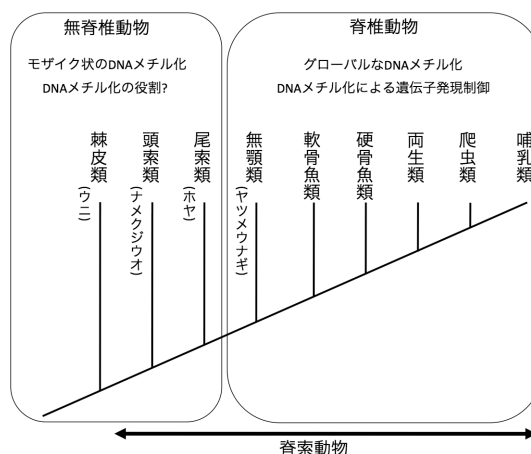


図 1. 進化上、無脊椎動物と脊椎動物の境界付近に位置する尾索類と無顎類

ヤツメウナギのうち、ウミヤツメについてはゲノム配列が決定されているものの、本研究では北海道産のカワヤツメを用いたため、TSS-seq だけでなく、全ゲノム配列決定も行った。ゲノム DNA はオス 1 個体の精子から抽出した。300 bp および 1.5 kb のペアエンドライブラリを作成し、それぞれ 101 塩基、151 塩基長で、4.7 億リード、1.8 億リードを取得した。de novo アセンブリは 256 GiB のメモリを搭載する計算機 HA8000/RS210 を使い、ALLPATHS-LG で行った。RNA については、ホヤ同様、胚から取得することとし、上記精子と、メス 1 個体から得られた卵を用いて受精させ、ステージ 26 の胚全体からサンプルを抽出した。TSS-seq は 76 塩基長で 8 千万リードを取得し、先に決めたゲノム配列に BWA を用いてマッピングした。また Trinity を用いて RNA-seq の de novo アセンブリも行った。

TSS-seqにより決められる個々の転写開始点はゲノム配列上に散らばっていることが知られており、RNAのアセンブリによって得られた配列を利用して局所的な最頻値から代表的転写開始点を決定し、ゲノムDNAのアセンブリ結果、さらには個々のリード情報を用いて領域を伸張させ、プロモータ配列を決定した。

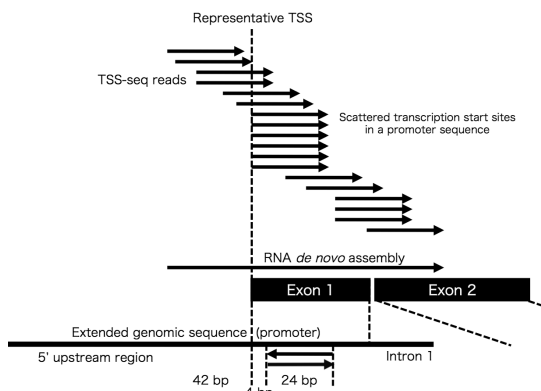


図 2. DNA の *de novo* アセンブリ、RNA の *de novo* アセンブリ、および TSS-seq によるプロモータ配列決定

4. 研究成果

カタユウレイボヤおよびヤツメウナギについて、今回初めて塩基レベルの正確さ、かつゲノム全体に渡って網羅的に転写開始点を決定することができた。また、その周辺領域、つまりプロモータ配列を得ることができ、配列的特徴を明らかにした。

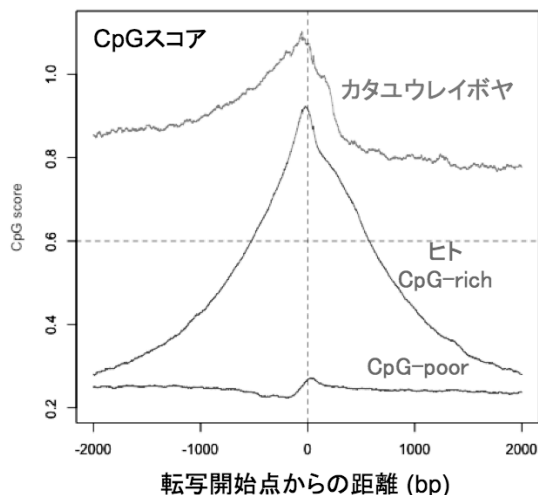


図 3. カタユウレイボヤの転写開始点近傍配列の CpG スコア変化をヒトの2つのタイプのプロモータ配列と比較

カタユウレイボヤのプロモータ配列はヒトの対応する配列と比較すると CpG スコアが非常に高く、一見、全てのプロモータが CpG アイランド型のように思われるが、G+C 含量や実際のサイト数で比較すると、CpG スコアが高くなるのは、期待値を計算する際の分母

となっている G+C 含量がきわめて低い結果であることが分かった。これはマウスやヒトに見られる CpG アイランド型のプロモータとは明らかに異なり、DNA メチル化が遺伝子発現制御に関わる以前の動物種が保持していた原始的なプロモータ配列であると考えられた。

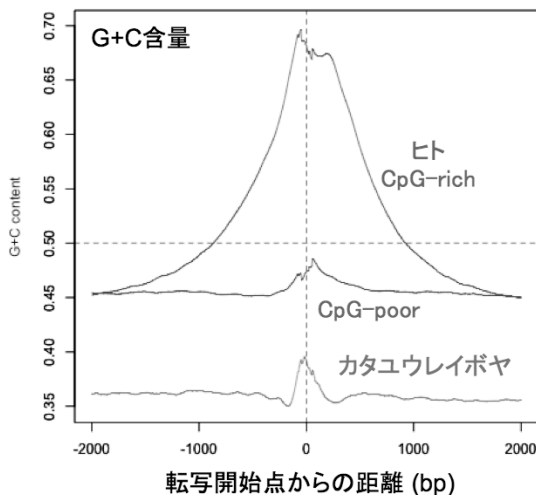


図 4. カタユウレイボヤの転写開始点近傍配列の G+C 含量変化をヒトの2つのタイプのプロモータ配列と比較

一方、ヤツメウナギのプロモータ配列は CpG スコアおよび G+C 含量ともに高く、ヒトの CpG アイランド型プロモータとよく似た特徴を示すことが明らかとなった。興味深いことに、ヤツメウナギのプロモータはそのほとんどが CpG アイランド型であり、非 CpG アイランド型のプロモータの存在は顕著ではなかった。

転写開始点は YR コンセンサスと呼ばれるピリミジン-プリン の 2 塩基から成るモチーフを持つことが知られている。ホヤでこの配列を調べると、CA、TG、および TA といった 2 塩基が主で、CG はほとんど転写開始点として使われていなかったが、ヤツメウナギは CA に加え CG の利用が顕著であった。この傾向はヒトのメチル化を受けない CpG アイランド型のプロモータにも確認されるため、CpG アイランド型プロモータの進化的な出現は、脊椎動物が登場したごく初期であると推定された。

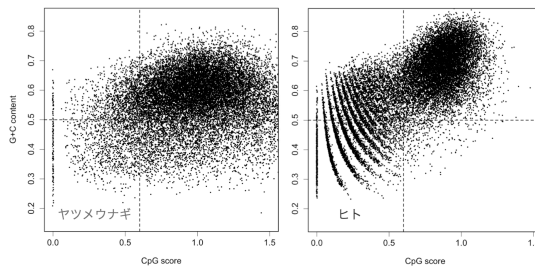


図 5. ヤツメウナギとヒトの全プロモータ配列における CpG スコアと G+C 含量の傾向、点線で区切った右上部が CpG アイランドに相当

CpG アイランドは通常、DNA メチル化を免れ、それゆえに脱アミノ化による TpG への変異を免れ、高い CpG 出現頻度を維持していると考えられる。それゆえメチル化による発現制御が重要なプロモータは、むしろ CpG サイトが少ない非 CpG アイランド型のプロモータであると考えられるが、ゲノムインプリンティングの制御を受ける遺伝子では、CpG アイランドのメチル化が明らかに発現制御に関わっており、ヤツメウナギの個々のプロモータ配列のメチル化状態がどのようになっているかは非常に興味深い。現在、PBAT 法を用い、カタユレイボヤ、およびヤツメウナギについて、全ゲノムに渡る DNA メチル化状態を調べているところで、これらの結果により、DNA メチル化が関わる転写制御の分子機構の詳細、さらには人為的な遺伝子発現制御の開発に向けた基盤となる情報が得られるものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] 以下全て査読あり (計 9 件)

- Miyata K, Miyata T, Nakabayashi K*, Okamura K, Naito M, Kawai T, Takada S, Kato K, Miyamoto S, Hata K, Asahara H*, DNA methylation analysis of human myoblasts during in vitro myogenic differentiation: *de novo* methylation of promoters of muscle-related genes and its involvement in transcriptional down-regulation, *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2, 410-423 (2015) doi: 10.1093/hmg/ddu457
- Hayashi K, Kawai YL, Yura K, Yoshida MA, Ogura A, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K*, Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the sparkling enope squid, *Watasenia scintillans*, *Mitochondrial DNA*, in press (2015) doi:10.3109/19401736.2014.971251
- Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A*, Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability, *Sci. Rep.* **4**, 5421 (2014) doi: 10.1038/srep05421
- Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, Umezawa A, Okamura K*, Hata K*, Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women, *J. Hum. Genet.* **59**, 6, 326-331 (2014) doi: 10.1038/jhg.2014.27
- Kawai YL, Yura K, Shindo M, Kusakabe R, Hayashi K, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K*, Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the river lamprey, *Lethenteron japonicum*, *Mitochondrial DNA*, in press (2014) doi:10.3109/19401736.2013.861432
- Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K*, Monk D*, Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent establishment of imprinting, *Genome Res.* **24**, 4, 554-569 (2014) doi: 10.1101/gr.164913.113
- Kusakabe R*, Tani S, Nishitsuji K, Shindo M, Okamura K, Miyamoto Y, Nakai K, Suzuki Y, Kusakabe TG, Inoue K, Characterization of the compact dicistronic microRNA precursor, *miR-1/miR-133*, expressed specifically in *Ciona* muscle tissues, *Gene Expr. Patterns* **13**, 45-50 (2013) doi: 10.1016/j.gexp.2012.11.001
- Okamura K, Yamashita R, Takimoto N, Nishitsuji K, Suzuki Y, Kusakabe TG, Nakai K*, Profiling ascidian promoters as the primordial type of vertebrate promoter, *BMC Genomics* **12**, Suppl 3, S7 (2011) doi: 10.1186/1471-2164-12-S3-S7
- Khare P, Mortimer SI, Cleto CL, Okamura K, Suzuki Y, Kusakabe T, Nakai K, Meedel TH, Hastings KE*, Cross-validated methods for promoter/transcription start site mapping in SL *trans*-spliced genes, established using the *Ciona intestinalis* troponin I gene, *Nucleic Acids Res.* **39**, 7, 2638-2648 (2011) doi: 10.1093/nar/gkq1151

[学会発表] (計 27 件)

- 三浦 史仁, 横山 貴央, 荒木 啓充, 岡村 浩司, 伊藤 隆司, MDL プロットを用いた比較メチローム解析, 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 P2-63 (2015 年 05 月 26 日), 学術総合センター
- 榊 みずほ, 老原 侑子, 岡村 浩司, 中林 一彦, 秦 健一郎, 小林 芳郎, 前原 佳代子, ヒト老化細胞を利用したエピゲノム解析, 第 37 回日本分子生物学会年会 3P-0736 (2014 年 11 月 27 日), パシフィコ横浜
- 横山 貴央, 三浦 史仁, 岡村 浩司, 伊藤 隆司, 変化点検出は単塩基解像度の DNA メチロームデータに基づくゲノムのドメイン分割に有効である, 第 37 回日本分子生物学会年会 3P-0195 (2014 年 11 月 27 日), パシフィコ横浜
- 富川 順子, 岡村 浩司, 林 恵子, 阿久津 英憲, 田中 智, 秦 健一郎, 中林 一彦, マウス初期発生過程における細胞種特異的なクロマチン高次構造の解析, 第 37 回日本分子生物学会年会 1LBA-29 (2014 年 11 月 25 日), パシフィコ横浜

5. 岡村 浩司, 河合 利尚, 林 恵子, 秦 健一郎, 小野寺 雅史, 中林 一彦, 遺伝子治療のための迅速で網羅的な染色体挿入部位同定法の開発, 第 37 回日本分子生物学会年会 1P-0956 (2014 年 11 月 25 日), パシフィコ横浜
6. 林 恵子, 秦 健一郎, 中林 一彦, 岡村 浩司, 塩基配列伸長アセンブラの開発およびマウス 3 系統のミトコンドリアゲノム配列の完全決定, 第 37 回日本分子生物学会年会 1P-0021 (2014 年 11 月 25 日), パシフィコ横浜
7. 谷垣 伸治, 右田 王介, 岡村 浩司, 秦 ひろか, 漆山 大知, 佐々木 かりん, 中林 一彦, 左合 治彦, 秦 健一郎, 原因不明胎児異常例におけるエクソーム解析の可能性, 日本人類遺伝学会第 59 回大会 1017-5 (2014 年 11 月 20 日), タワーホール船堀
8. Migita O, Maehara K, Nakabayashi K, Okamura K, Hata K, Copy number variants identified in Japanese women, The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 611M (October 20, 2014), San Diego Convention Center, San Diego, U. S.
9. Okamura K, Igarashi A, Takeda K, Kiyokawa N, Matsumoto K, A comprehensive correlation analysis of all human genes and miRNAs using tissue samples, Regulatory & Non-Coding RNAs, 120 (August 28, 2014), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U. S.
10. 富川 順子, 前原 一満, 岡村 浩司, 林 恵子, 阿久津 英憲, 田中 智, 大川 恭行, 秦 健一郎, 中林 一彦, Hi-C 法による細胞種特異的なクロマチン高次構造解析, 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 P-34 (2014 年 05 月 27 日), 伊藤国際学術研究センター
11. 横山 貴央, 三浦 史仁, 岡村 浩司, 日下部 岳広, 伊藤 隆司, ホヤのメチローム解析から探る組織特異的メチル化の起源, 第 36 回日本分子生物学会年会 3P-0040 (2013 年 12 月 05 日), 神戸ポートピアホテル
12. 伏見 麻由, 由良 敬, 岡村 浩司, ヒトおよびアカゲザルの CpG アイランドプロモータ配列比較解析, 第 36 回日本分子生物学会年会 3P-0015 (2013 年 12 月 05 日), 神戸ポートピアホテル
13. 川井 優里, 由良 敬, 進導 美幸, 日下部 りえ, 林 恵子, 秦 健一郎, 中林 一彦, 岡村 浩司, ヤツメウナギのミトコンドリアゲノム全配列決定および近縁種との比較解析, 第 36 回日本分子生物学会年会 2P-0024 (2013 年 12 月 04 日), 神戸ポートピアホテル
14. 岡村 浩司, 進導 美幸, 日下部 りえ, 鈴木 穰, 林 恵子, 秦 健一郎, 中林 一彦, ヤツメウナギゲノムにおける転写開始点決定およびプロモータ配列の特徴, 第 36 回日本分子生物学会年会 2P-0023 (2013 年 12 月 04 日), 神戸ポートピアホテル
15. 右田 王介, 岡村 浩司, 前原 佳代子, 嘉村 浩美, 中林 一彦, 秦 健一郎, 日本人正常分娩集団に観察される遺伝的多様性, 日本人類遺伝学会第 58 回大会 P144 (2013 年 11 月 22 日), 江陽グランドホテル
16. 岡村 浩司, 富川 順子, 林 恵子, 阿久津 英憲, 秦 健一郎, 中林 一彦, 近交系マウス C57BL/6 および JF1 の全ゲノムリシークエンシング, 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 P-141 (2013 年 05 月 31 日), 奈良県新公会堂
17. 宮田 知子, 中林 一彦, 岡村 浩司, 小林 裕明, 奥川 馨, 矢幡 秀昭, 園田 顕三, 加藤 聖子, 秦 健一郎, 子宮平滑筋肉腫の分子病態の統合解析, 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 P-16 (2013 年 05 月 30 日), 奈良県新公会堂
18. 岡村 浩司, 林 恵子, 富川 順子, 阿久津 英憲, 秦 健一郎, 中林 一彦, 相互交雑マウスを用いた網羅的な多型検索とアレル別発現解析, 第 35 回日本分子生物学会年会 4W2I-6/4P-0148 (2012 年 12 月 14 日), 福岡国際会議場
19. 右田 王介, 前原 佳代子, 岡村 浩司, 西濱 啓一郎, 中林 一彦, 秦 健一郎, 日本人集団に共通するコピー数多型, 第 35 回日本分子生物学会年会 1P-0595 (2012 年 12 月 11 日), マリンメッセ福岡
20. 田山 千春, アレックス マーティン, 岡村 浩司, 緒方 勤, 副島 英伸, デビット モンク, 秦 健一郎, 中林 一彦, 全ゲノム片親性ダイソミー症例の DNA メチル化解析によるヒトインプリントーム解明, 第 35 回日本分子生物学会年会 1W1I-7/1P-0118 (2012 年 12 月 11 日), 福岡国際会議場
21. 川井 優里, 矢野 緑里, 加藤 律子, 岡村 浩司, 遺伝子発現データに基づく HTF アイランドプロモータの定義と配列の特徴, 第 34 回日本分子生物学会年会 4P-0106 (2011 年 12 月 16 日), パシフィコ横浜
22. 五島 杏奈, 西尾 瞳, 加藤 律子, 吉田 亘, 川口 壽太郎, 中林 一彦, 岡村 浩司, レトロトランスポジションによるアレル特異的 DMR の生成, 第 34 回日本分子生物学会年会 4P-0013 (2011 年 12 月 16 日), パシフィコ横浜
23. 横山 貴央, 三浦 史仁, 岡村 浩司, 日下部 岳広, 伊藤 隆司, ホヤのメチローム解析から探る組織特異的プロモータメチル化の起源, 第 34 回日本分子生物学会年会 2P-0124 (2011 年 12 月 14 日), パシフィコ横浜
24. Okamura K, Yamashita R, Takimoto N, Nishitsuji K, Suzuki Y, Kusakabe TG, Nakai K, Profiling ascidian promoters as the primordial type of vertebrate promoter, The 10th International Conference on Bioinformatics 6.1 (November 30, 2011), Renaissance Kuala Lumpur Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia
25. Fushimi M, Okamura K, Identification and characterization of protochordate promoters, Young Researchers Conference on Evolutionary Genomics P-01 (August 01, 2011), National Center for Sciences Building, Tokyo, Japan
26. Okamura K, Matsumoto KA, Nakai K, Gradual

transition from mosaic to global DNA methylation patterns during deuterostome evolution, The 9th International Conference on Bioinformatics S2 (September 26, 2010), Waseda University, Tokyo, Japan

27. Okamura K, Inference of DNA methylation and its evolution from the ratio of observed to expected number of CpG, The 4th Virtual Training Workshop on Bioinformatics 38 (September 24, 2010), Kyushu Institute of Technology, Fukuoka, Japan (on-line)

[その他]

新規開発したアセンブラのウェブサイト
GrepWalk - extention-based genome assembler
<http://epigenetics.nrichd.ncchd.go.jp/grepwalk/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 浩司 (Kohji Okamura)
国立成育医療研究センター
システム発生・再生医学研究部
室長
研究者番号： 80456194

(2) 研究分担者

なし