

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651210

研究課題名(和文) ヒドロキシメチルシトシンの塩基単位での同定法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel method to identify the hydroxymethylcytosine in single base resolution.

研究代表者

幸田 尚 (KOHDA, Takashi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：60211893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類ゲノムのエピジェネティックな調節においてDNAのメチル化は重要な役割を果たしている。最近、メチルシトシンがヒドロキシメチルシトシンへ酸化される反応が存在することが示され、脱メチル化の中間産物として注目されている。そこでヒドロキシメチルシトシンの1塩基単位での解析法が重要であるが、これまで提案されてきた手法は十分なものではなかった。そこでDNMT1酵素を用いた単純な原理を用いて、比較的微量のDNAから1塩基単位でメチルシトシンとヒドロキシメチルシトシンを区別して解析する手法を考案し、実際に96%という高精度でヒドロキシメチルシトシンを同定することが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is one of the important modifications in epigenetic regulation of mammalian genome system. Recently, the oxidation reaction of methylcytosine to hydroxymethylcytosine is discovered. Thus, it is important to establish a method to identify the hydroxymethylcytosine of the genome in single base resolution. Here I provide a novel method to identify the methylcytosine and the hydroxymethylcytosine with high accuracy (more than 95%) using DNMT1 enzyme.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：エピゲノム ヒドロキシメチルシトシン

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類のゲノムのエピジェネティックな調節において DNA のメチル化は重要な役割を果たしている。申請者はゲノムインプリンティングや体細胞クローニングにおけるゲノムのリプログラミングについて研究を行ってきた。始原生殖細胞におけるインプリンティング遺伝子の脱メチル化や、体細胞クローンや受精直後の胚のゲノムの大幅な脱メチル化の反応は、個体の発生にとって必須の過程である。また、脳の神経細胞のように post-mitotic な細胞における遺伝子発現の調節においてもゲノムの脱メチル化の解析なども重要である。しかし DNA のメチル化の反応に比べて脱メチル化の反応についての研究は遅れていた。最近、この脱メチル化の反応にメチルシトシン(mC)のヒドロキシメチルシトシン(hmC)への変換が重要であることが明らかになり、注目を集めている。この脱メチル化の過程のメカニズムを明らかにするためには、個別の配列でもゲノムワイドの解析においてもヒドロキシメチル化修飾の位置を解析することは重要となっているが、現在のところ 1 塩基単位で解析する手段がない。原理的には単分子シーケンサを用いた手法が応用可能であるとの報告があるが、実際の適用例はまだ報告されていない。また、特定の領域について解析する場合は次世代シーケンサを用いることは現実的ではなく、特定の配列の解析にも使える簡便かつ応用範囲の広い手法の開発が望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、修飾されていないシトシン(C)、mC、hmC を 1 塩基レベルで同定する新しい手法を確立することである。そこで、これまで mC を 1 塩基レベルで同定するシーケンサ法として使われてきた bisulfite シーケンサ法を応用して、ゲノム上の特定の領域でも、あるいはゲノム全体についても 1 塩基レベルでかつ同一分子上で C、mC、hmC を区別してシーケンサする新しい手法を考案した。モデル基質を作成して、実際この実験手法が C、mC、hmC の同定に用いることが可能であることを示し、また同定の精度がどの程度であるかを明らかにすること、更には実際にゲノムの DNA を用いてこの手法が解析に適用可能であることを示すことにより、この新しい解析法の有効性を示すこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 解析法の考案

本研究で mC、hmC を区別して塩基単位で解析を行う新技術として、図 1 に示す手法を考案し、EnIGMA(Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay)法をと命名した。本法は維持メチル化酵素である DNMT1 が hemi-mC の逆鎖のシトシンをメチル化しますが hemi-hmC の逆鎖のシトシンはメチル化し

ない性質を持つことを利用し、mC と hmC を区別する方法である。

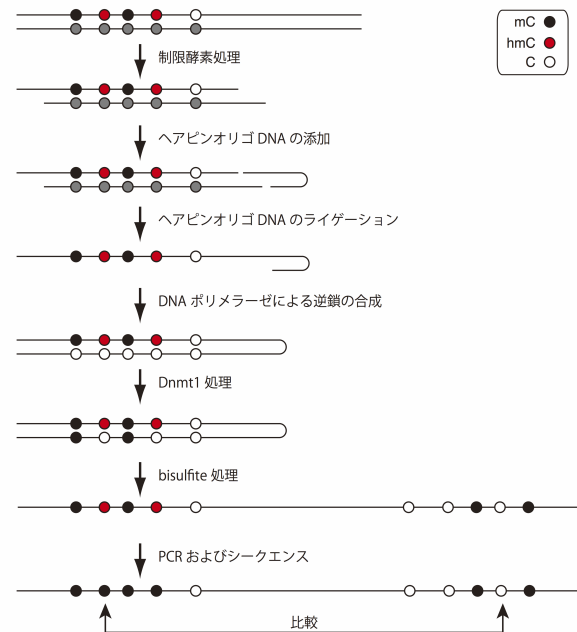


図 1 EnIGMA (Enzyme assisted Identification of Genome Modification Analysis) 法の原理

具体的には、ゲノムを 5' 突出の切断点を持つ制限酵素で切断後、ヘアピンを形成する合成 DNA を末端に結合する。この際、合成 DNA の 5' はリン酸化し、3' 端は 1 塩基のギャップを残すように設計を行い、これをプライマーとして nick translation と同様に E. coli DNA polymerase を用いて逆鎖の合成を行う。その後、この DNA を DNMT1 酵素で処理することによりメチル化を行うと、元の DNA 鎖が mC であれば対応する部分もメチル化されるが、hmC である場合はメチル化されない。処理後の DNA を bisulfite 処理して全体を PCR で増幅し配列を決定することにより、元の配列と連結された逆鎖の対応部分のメチル化状態をあわせて解析することで C、mC、hmC を同定することを可能にする。

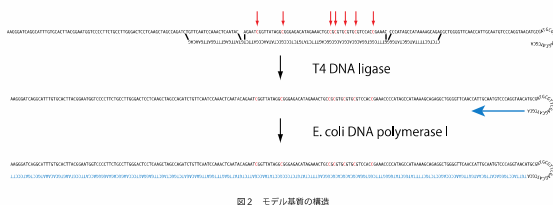
#### (2) モデル基質の作成

マウス H19 DMR 領域の配列の一部とヘアピン DNA を連結したような 3 断片の DNA を合成した。この時、中央に示した配列の赤の矢印で示した CpG をすべて mC、hmC あるいは非修飾の C とした 3 種類の合成 DNA を用意した。更に逆鎖の DNA を合成してガイドとしてアニールさせ、3 断片を ligation した後、E. coli DNA polymerase I を用いて逆鎖の合成を行い、モデル基質とした。

#### (3) モデル基質を用いた EnIGMA 法の実証

大阪大学蛋白質研究所の田嶋正二教授より供与していただいたヒト DNMT1 酵素を用いて、hemi-mC、hemi-hmC および非修飾のシトシン

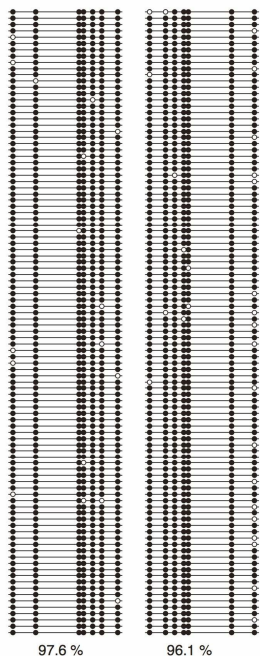
の3種類のモデル基質のメチル化を行った。



酵素反応を行ったものを bisulfite 処理し、PCR にて増幅後、fusion method に従って IonPGM シークエンサーを用いて配列を決定し、前半の合成 DNA 部分および後半の E. coli DNA polymerase I によって合成した部分の7カ所の CpG についてシトシンのまま変化していないものの数を計数した。

#### 4. 研究成果

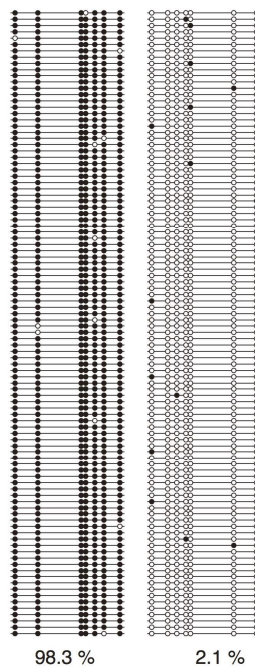
(1) モデル基質を用いた EnIGMA 法の実証  
至適の反応条件を検討した結果、mC を使った合成基質について DNMT1 反応をしたあと bisulfite 処理を行い、PCR 後にシーケンスをした結果7カ所の CpG についてシトシンとして残ったものを黒丸、チミンに変換されたものを白丸として図3に示した。



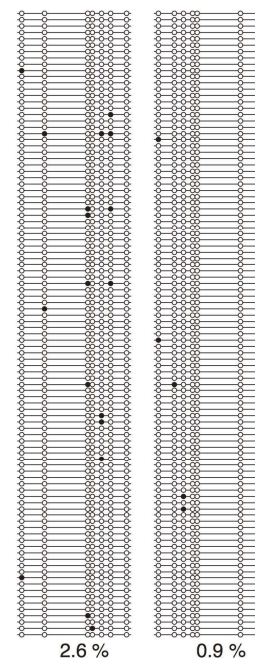
図の左側が合成基質による部分、右側が DNMT1 によってメチル化を行った逆鎖部分に相当している。

図から明らかなように逆鎖のシトシンは DNMT1 によって 96%と高い効率で CpG のシトシンをメチル化できることが示された。一方、hmC の合成基質については図4に示すように、既報の通り bisulfite 反応により mC と同程度にウラシルに変換されないこと、DNMT1 は逆鎖のシトシンをほとんど(2%)メチ

ル化しないことが示された。



また、非修飾のシトシンの合成基質では、図5に示すようにどちらの部分も 1~2%程度ウラシルに変換されない CpG が認められた。



CpG 以外のシトシンで変換されないものはこの条件で 0.3%以下であったことから、2%程度は DNMT1 の de novo のメチル化活性によってメチル化されたものであると考えられる。このことから、mC、hmC、C についていずれの修飾状態でも 95%以上の精度での同定が可能であることが示された。

(2)ゲノム DNA を用いた EnIGMA 法の実証  
マウスのゲノムを用いて、同様の反応条件で  
H19 遺伝子の CGI 領域について EnIGMA 法を用  
いて解析が可能であることを示した。ゲノム  
DNA としては 50 ng 程度の量を用いれば十分  
解析が可能であったことから、本法は十分実  
用的であることを示すことができた。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者名: 幸田尚、川崎佑季、石野史敏  
標題: DNMT1 を用いた新しいヒドロキシメチ  
ルシトシンの同定法—EnIGMA 法の開発 学  
会等名: 日本エピジェネティクス研究会  
発表年月日: 2014 年 5 月 25 日～27 日 発  
表場所: 東京大学(東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:  
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

幸田 尚 (KOHDA, Takashi)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教  
授  
研究者番号: 60211893

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: