

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651214

研究課題名(和文)メチル化模様を保持したDNA増幅技術の開発に関する研究

研究課題名(英文)DNA amplification conserving DNA methylation patterns

研究代表者

田嶋 正二(Tajima, Shoji)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：50132931

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)：ヘミメチルDNAを好んでメチル化する維持DNAメチル化酵素のDnmt1を利用して、メチル化状態を保ったままゲノムを増幅する技術と、それをもとにして、ヒドロキシル化修飾を受けたメチルシトシンを一塩基レベルで解析する技術を開発することをめざした。その結果、シトシンのメチル化修飾とヒドロキシメチル化修飾を配列上で区別して解析する手法を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in establishing the method to distinguish methylated and hydroxy methylated cytosine in a single nucleotide resolution using recombinant maintenance DNA methyltransferase Dnmt1, which favors to methylate hemi-methylated DNA.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：生物工学 DNAメチル化 DNAメチル化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムのメチル化模様は、長期間安定に遺伝情報の発現を抑制する“エピジェネティック”な印として、高等生物で広く利用されている。メチル化模様の樹立と維持は責任酵素が同定されており、解析は進んでいるが、逆方向の“脱メチル化”の機構については、最近、有力な責任酵素が同定されたものの、最終的な脱メチル化段階の分子機構とその意義についてはまだ不明な点が多々ある。脱メチル化反応の責任酵素として、メチルシトシンのヒドロキシ化を触媒する酸素添加酵素 TET1、2、3 が注目されている。ゲノムのヒドロキシメチルシトシンを定量する方法は様々な方法が報告され、利用可能である。一方、ヒドロキシ化されたメチルシトシンをゲノム内で一塩基レベルの解像度で解析する方法は、これまで3つの方法が報告されているが、必ずしも確立しているわけではない。報告されている方法は、ヒドロキシメチルシトシンを酸化触媒により修飾する2つの方法と、ヒドロキシメチルシトシンを TET 酵素によりさらに酸化を進行させる方法である。いずれの方法でも、酸化後にバイサルファイト法を用いてメチルシトシンとの分別を行う。現段階では、どの方法にも難がある。酸化法はゲノムの断片化が避けられず、条件設定が難しい。また TET を用いる方法はゲノム内のヒドロキシメチルシトシンをカルボキシメチルシトシンに完全に変換させる効率に難がある。一塩基レベルで解析する技術は、生体内における脱メチル化の機能を解析するうえで欠かせない技術であり、その安定で、使いやすい技術を開発することは急務である。

### 2. 研究の目的

維持メチル化酵素である Dnmt1 は、ヘミメチル DNA を選択的にメチル化してフルメチル DNA に変換するが、ヘミヒドロキシメチル DNA を維持メチル化できない。本研究計画では、DNA メチル化酵素 Dnmt1 のもつこの特徴的な性質を利用して、メチル化状態は保持するがヒドロキシメチル化状態を消去してゲノムを増幅する技術を確認する。このようにして調製した DNA について、メチル化修飾を受けている部位と、ヒドロキシ化修飾を受けている部位を一塩基レベルで分別、同定する技術を開発する。

### 3. 研究の方法

マウスの野生型 Dnmt1、改変型 Dnmt1 とヒト DNMT1 の組換え体を昆虫細胞で発現させ、これを高純度で精製し、ヘミメチル DNA とヘミヒドロキシメチル DNA を区別して維持メチル化するための酵素標品とした。

ヘミメチルとヘミヒドロキシメチルを組み込んだ 100 塩基対のモデル DNA を合成して、各種の組換え DNA メチル化酵素がヘミメチルとヘミヒドロキシメチルを分別して維持メ

チル化するのかを検証するための基質とした。

合成 DNA をメチル基受容体として、各種組換え DNA メチル化酵素の量、塩の種類と濃度、温度、反応時間によって、メチル基受容基質内のヘミメチル CpG とヘミヒドロキシメチル CpG の維持メチル化がどのような影響を受けるのかについて、バイサルファイト法により解析した。同時にバイサルファイト反応後の DNA の至適な回収条件についても検討した。

マウス野生型 Dnmt1、変異型 Dnmt1、ヒト DNMT1 によるメチル化結果の解析をおこない、比較して、ヘミメチル化部位の維持メチル化とヘミヒドロキシメチル化部位の脱メチル化の成績が最も優れている酵素源を決め、その組換え酵素を用いて、反応系の条件を決定した。

### 4. 研究成果

メチル化酵素の種類、DNA と酵素の濃度比、塩の種類と濃度、温度、反応時間、DNA の回収方法について条件検討をおこない、解析条件を決定した。その結果、ヒト DNMT1 を用いることにより、ヘミヒドロキシメチル DNA とヘミメチル DNA を精度高く分別して維持メチル化する条件を確認した。これにより、従来法とは異なる、ヒドロキシメチルシトシンを一塩基レベルで解析する技術を開発した。

一方解析の過程で、DNMT1 を用いたとき安定にヒドロキシメチル化状態を解析できない配列が明らかになった。すなわち、メチル化された CpG が密に存在して、その中にヒドロキシメチル CpG が配置されているとき、ヘミヒドロキシメチル状態であっても DNMT1 はメチル化してしまう傾向が認められた。このことは、CpG アイランドが高度にメチル化されていて、その中に少量のヒドロキシメチル CpG が存在する場合は、ヒドロキシメチル化された CpG を検出できない可能性があることを示している。ただ、ゲノム内の CpG が密に存在する領域は一般に低メチル化状態である場合が多く、CpG が疎な個所のメチル化が、分化に依存した脱メチル化には重要であることが知られているので、ここで開発した、DNMT1 を用いた技術は、限定的ではあるものの、有用であると考えられる。

DNMT1 による、ある CpG がヘミヒドロキシメチル化状態にあっても周りの CpG メチル化密度によっては相補鎖にメチル基を入れてしまうという性質は、CpG アイランドが密にメチル化されている場合は、たとえ一部が TET によりヒドロキシメチル化されていたとしても、脱メチル化には向かわずメチル化が維持されることを意味している。技術的な視点を離れると、これは、生体内における DNA メチル化状態の維持機構を理解するうえで非常に興味深い性質であり、今後検証に値する知見である。

結論として、ヒト組換え DNMT1 を用いた方法は、ヒドロキシメチルシトシンの一塩基レ

ベルでの解析方法の一つとして利用するに値する技術であると考える。

#### 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9件)

Ahmet Can Berkyurek, Isao Suetake, Kyohei Arita, Kohei Takeshita, Atsushi Nakagawa, Masahiro Shirakawa, Shoji Tajima. The DNA methyltransferase Dnmt1 directly interacts with the SET and RING finger associated (SRA) domain of the multifunctional protein Uhrf1 to facilitate accession of the catalytic center to hemi-methylated DNA. *J. Biol. Chem.* **289**, 379-386, 2014. Doi: 10.1074/jbc.M113.523209, 査読有

Junji Otani, Hironobu Kimura, Jafar Sharif, Takaho A. Endo, Yuichi Mishima, Toru Kawakami, Haruhiko Koseki, Masahiro Shirakawa, Isao Suetake, Shoji Tajima. Cell cycle-dependent turnover of 5-hydroxymethyl cytosine in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* **8**, e82961, 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0082961. eCollection, 査読有

##### [学会発表](計22件)

末武 勲他、組換え DNMT1 を利用したヒドロキシメチルシトシンの1塩基レベルの新規解析方法の開発、第8回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年5月22-24日、東京大学伊藤国際会館

アーメット・キャン・ベルキュレック他、Dnmt1 (RFTS) と Uhrf1 (SRA) の相互作用により DNA は触媒中心に近づけるようになる、第8回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年5月22-24日、東京大学伊藤国際会館

木村 博信他、プロモーター領域でのヒドロキシメチルシトシンのメチルシトシンに対する相対位置は遺伝子発現と相関する、第8回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年5月22-24日、東京大学伊藤国際会館

ロナルド G. ガルビレス他、遺伝性知覚神経疾患の原因となる Dnmt1 の RFTS 内の変異が DNA 維持メチルに及ぼす影響、第8

回日本エピジェネティクス研究会年会、2014年5月22-24日、東京大学伊藤国際会館

Hironobu Kimura et al., Relative positions of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at promoter correlates with the level of gene expression. International Symposium on Transcription and metabolism. Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan, November, 11-13, 2013.

ロナルド G. ガルビレス他、Dnmt1 の RFTS と触媒領域間の水素結合の DNA メチル化に果たす役割、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2013年5月30-31日、奈良県新公会堂

アーメット・キャン・ベルキュレック他、DNA 鎖長と Np95 の SRA 領域は Dnmt1 の RFTS を触媒ポケットから除去するステップに寄与する、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2013年5月30-31日、奈良県新公会堂

木村 博信他、マウス ES 細胞におけるヒドロキシメチルシトシンの産生と消去、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2013年5月30-31日、奈良県新公会堂

岡 翔太他、ヘミメチル化 DNA によるヌクレオソーム再構成と Dnmt1 によるメチル化、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2013年5月30-31日、奈良県新公会堂

Shoji Tajima, Multi-step process of maintenance methylation. FASEB Science Research Conference on Biological Methylation: From DNA and Histones to Disease, August 12-17, 2012, The Westin Conference Center, Snowmass Village, Colorado, USA.

末武 勲他、Dnmt1 による DNA 維持メチル化活性は領域の大きな再配置を伴う反応である、第6回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月14-15日、学術総合センター(東京)

長谷川 貴志他、Dnmt1 による DNA 維持メチル化の *in vivo* における責任領域、第6回日本エピジェネティクス研究会年会、

2012年5月14-15日、学術総合センター  
(東京)

〔図書〕(計2件)

田嶋 正二、化学同人、エビジェネティクス-その分子機構から高次生命機能まで-(田嶋 正二編集) 2013年、pp 3-20

木村 博信他、羊土社、エビジェネティクスキーワード事典-分子機構から疾患・解析技術まで-(牛島 俊和、眞貝 洋一編集) 2013年、pp 20-25

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

発表論文 の URL :

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/jpn/achievement/papers/the-dna-methyltransferase-dnmt.php>

発表論文 の URL :

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/jpn/achievement/papers/cell-cycle-dependent-turnover-1.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田嶋 正二 (TAJIMA Shoji)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号 : 50132931

(2)研究分担者

木村 博信 (KIMURA Hironobu)  
大阪大学・蛋白質研究所・助教  
研究者番号 : 60378891