

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650007

研究課題名(和文) 転写伸長機構を介したDNAメチル化機構の解明

研究課題名(英文) DNA methylation coupled with transcription elongation machinery

研究代表者

木村 博信 (Kimura, Hironobu)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：60378891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いた解析により、転写活性の高い遺伝子のgene bodyが高メチル化状態になっていることが明らかになっている。本研究計画は、DNAメチル化機構と転写伸長機構が、どのようにしてDNAメチル化模様形成に関わっているのかを明らかにすることを目的にした。その結果、1.細胞内においてDnmt3aとRpb1は結合していること、2.転写が活性化している遺伝子のgene bodyにおいて、Dnmt3a、Rpb1とH3K36me3が存在していること、3. Dnmt3a およびDnmt3bの両方がgene bodyのDNAメチル化に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent whole genome bisulfite sequencing analysis with next generation sequencer reveals that DNA methylation exist not only at promoter, but also at gene bodies of highly transcribed genes. Previously, I purified the Dnmt3a complex from mouse embryonic stem cell (mESC), and found that Rpb1 and Supt6h, which are components of transcriptional elongation machinery, were co-purified with Dnmt3a. To elucidate the mechanism underlying in the gene body methylation, I focused in an interaction of Dnmt3a and transcriptional elongation machinery. I found that (1) Dnmt3a and Rpb1 bound in mESC, NIH3T3 and N1E115, (2) Dnmt3a localized on gene body of Atp5b gene, which is highly transcribed in mESC, in the same manner with the elongating Rpb1 (phosphorylated CTD-Ser2) and H3K36me3, (3) both of Dnmt3a and Dnmt3b contributed on the gene body methylation.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：DNAメチル化 転写伸長

1. 研究開始当初の背景

高等動物では、受精卵が個体を形成する様々な組織の細胞へと分化していくためには、塩基配列に書き込まれた配列情報の他に、DNA メチル化やヒストンの修飾など、エピジェネティックと呼ばれる可逆的な遺伝情報制御機構が必須である。一般に DNA メチル化は DNA の修飾を介して遺伝子の発現抑制にかかわり、胚発生や細胞分化に決定的な役割を担うことが知られている。

私は DNA メチル化模様形成機構を明らかにする目的で、新規にメチル基を導入する活性をもつ Dnmt3a とともに精製されるタンパク質を質量分析法により探索・同定している。DNA メチル化の転写抑制機能から予想されるように、転写抑制因子 Trim28 (KAP1) やモノユビキチン化ヒストン H2A などを同定した。しかし驚いたことに、RPB1 と Supt6h という、転写伸長にかかわる因子を高いスコアで同定した。RPB1 は RNA ポリメラーゼ II を構成するサブユニットの一つであり、Supt6h は RPB1 と結合する転写促進因子である。DNA メチル化は必ずしも転写抑制とリンクしているわけではなく、転写が活性化された遺伝子の gene body に DNA メチル化が高密度で存在することも報告されている (Hellman and Chess, Science 2007; Ball et al, Nature Biotechnol 2009; Wu et al, Science 2010)。一方、DNA メチル化酵素の Dnmt3a の PWWP ドメインは転写伸長促進に関わるヒストン H3 の 36 番目のリシンのトリメチル化 (H3K36me3) を認識することが報告されている (Dhayalan et al, J Biol Chem 2010)。この報告は H3K36me3 が Dnmt3a をリクルートして gene body メチル化を行っていることを想像させる。しかし、H3K36 メチル化酵素のノックダウンによって gene body のメチル化状態には大きな変化が見られない (Hahn et al, PLoS One 2011) など、話はそれほど単純ではない。おそらく、転写が活性化された遺伝子の gene body メチル化は Dnmt3a の PWWP ドメインによる H3K36me3 の認識とは別経路で制御されていると考えられる。

2. 研究の目的

一般に高等真核生物のゲノムのメチル化修飾は遺伝情報発現に抑制的に働く“エピジェネティック”要因の一つであり、高等動植物では発生・分化に重要な役割を果たすとされる。ところが、次世代シーケンサーによる網羅的解析により、転写が活性化された遺伝子の gene body (遺伝子内領域) が高密度でメチル化されていることが報告されている。この gene body の DNA メチル化の機能は不明であり、また、そのメチル化機構についてもよくわかっていない。

本研究計画では、gene body の DNA メチル化模様がどのように形成されるのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Dnmt3a と Rpb1 および Supt6h の結合
全細胞抽出液を用いて、抗 Dnmt3a 抗体、抗 Rpb1 抗体および抗 Supt6h 抗体で免疫沈降法により、結合を確認した。また、RNA の関与がないことを、RNase を免疫沈降時に加え、確認した。

(2) DNA メチル化データの解析
既報の RNA-seq データ (GSM1177739) とメチロームデータ (GSM1027571) を用いて、候補遺伝子の抽出をおこなった。遺伝子全長が 1kb 以上の遺伝子で、mESC で発現が高い遺伝子 (Top200) について、gene body のメチル化状態を解析した。

(3) *Atp5b* 遺伝子 gene body における DNA メチル化状態の解析
細胞からゲノムを抽出し、MBD pulldown assay およびバイサルファイトシーケンシング法を用いて解析をおこなった。

(4) *Atp5b* 遺伝子 gene body における Dnmt3a および Rpb1 の局在

抗 Dnmt3a 抗体、抗 Rpb1-ser2 抗体、抗 H3K36me3 抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法により、*Atp5b* 遺伝子 gene body における Dnmt3a、Rpb1 および H3K36me3 の局在を調べた。

4. 研究成果

(1) Rpb1 と dnmt3a の結合

先行研究により、Dnmt3a と相互作用する蛋白質の網羅的解析により、転写身長因子である Rpb1 と Supt6h が同定された。そこで、マウス ES 細胞 (mESC) を用いて、Rpb1 と Supt6h が Dnmt3a と結合をするのかを確認した。その結果、Rpb1 と Dnmt3a が mESC 内で結合していることが明らかになった。一方、Supt6h の結合は確認できなかった。以降、Rpb1 の結合について詳細に調べることにした。

他の培養細胞 (NIH3T3, N1E115) でも、mESC と同様、Rpb1 と Dnmt3a の結合が確認できた。このことから、細胞種に関係なく Dnmt3a と Rpb1 は結合している可能性が示唆された。

(2) gene body における DNA メチル化

Dnmt3a が Rpb1 と協調して gene body の DNA メチル化に関与しているかを調べるために、クロマチン免疫沈降を用いて、クロマチン上で共局在するのかを調べた。まず、mESC の DNA メチル化データより、gene body の DNA メチル化を受けている遺伝子の同定をおこなった。転写活性の高い上位 200 遺伝子における DNA メチル化状態を抽出したところ、これまでの報告通り、3' 側にかけて DNA メチル化が高くなっていった。これらの遺伝子の中から、*Atp5b* 遺伝子に注目した。まず、*Atp5b* 遺伝子内の DNA メチル化状態を確認した。その結果、調べたエキソン 6 およびエキソン 8 付近でメチル化状態が高く、転写開始点および転写終結点では、ほとんど DNA メチル化は確認できなかった。

(3) *Atp5b* 遺伝子 gene body における Dnmt3a と Rpb1 の局在

Atp5b 遺伝子 gene body における DNA メチル化に Dnmt3a および Rpb1 が関与しているのかを明らかにするためにクロマチン免疫沈降法を用いて調べた。Dnmt3a は、転写開始点で最も少なく、3' 側に進むにつれて高いことが明らかになった。Rpb1 の局在は、CTD 領域のリン酸化によって異なることが明らかになっている。転写伸長中の Rpb1 は CTD 領域の Ser2 がリン酸化されている。そこで、Ser2 のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いて調べたところ、Dnmt3a と同様に、転写開始点で最も低く、3' 側に進むにつれて高かった。さらに、転写伸長中のエピジェネティクスマーカーである Histone H3K36 のトリメチル化について調べたところ、Dnmt3a、Rpb1 と同様に、転写開始点で最も低く、3' 側に進むにつれて高いことが明らかになった。

(4) *Atp5b* 遺伝子 gene body における DNA メチル化に関わる Dnmt の同定

これまでの報告から、Dnmt3a および Dnmt3b を欠損した mESC では gene body の DNA メチル化が消失することが明らかになっている。そこで、gene body の DNA メチル化に関与する Dnmt3 を同定するために、Dnmt3a 欠損 mESC および Dnmt3b 欠損 mESC を用いて、*Atp5b* 遺伝子 gene body における DNA メチル化状態を調べた。これまでの報告と同様に、Dnmt3a および Dnmt3b の両方を欠損した mESC では、DNA メチル化は消失していた。一方、Dnmt3a 欠損 mESC および Dnmt3b 欠損 mESC では、約 50% に低下していた。この結果から、mESC における gene body の DNA メチル化は、Dnmt3a および Dnmt3b の両方が関与してい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 6 件)

Otani, J., Arita, K., Kato, T., Kinoshita, M., Kimura, H., Suetake, I., Tajima, S., Ariyoshi, M., Shirakawa, M. Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl-CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4. *Journal of Biological Chemistry*, 288 (9), 6351-6362, 2013.
*Otani, J., *Kimura, H., Sharif, J., Endo, T. A., Mishima, Y., Kawakami, T., Koseki, H., Shirakawa, M., Suetake, I., Tajima, S. Cell cycle-dependent turnover of 5-hydroxymethyl cytosine in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* 8(12): e82961, 2013. (*: equally contribution)

Horii, T., Morita, S., Kimura, M., Kobayashi, R., Tamura, D., Takahashi, R., Kimura, H., Suetake, I., Ohata, H., Okamoto, K., Tajima, S., Ochiya, T., Abe, Y. and Hatada, I. Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system. *PeerJ* 1:e230, 2013.
Mori, S., Nada, S., Kimura, H., Tajima, S., Takahashi, Y., Kitamura, A., Oneyama, C., Okada, M. The mTOR Pathway Controls Cell Proliferation by Regulating the FoxO3a Transcription Factor via SGK1 Kinase *PLoS ONE* 9(2): e88891, 2014.
Mishima, Y., Jayasinghe, C., Lu, K., Otani, J. Shirakawa, M., Kawakami, T., Kimura, H., Hojo, H., Carlton, P. Tajima, S. Suetake, I. Nucleosome compaction facilitates HP1 binding to methylated H3K9. *Nucleic Acids Research*, 43 (21): 10200-10212, 2015.
Garvilles, R., Hasegawa, T., Kimura, H., Sharif, J., Muto, M., Koseki, H., Takahashi, S, Suetake, I., Tajima, S. Dual functions of the RFTS domain of Dnmt1 in replication-coupled DNA methylation and in protection of the genome from aberrant methylation. *PLoS ONE* 10(9): e0137509, 2015.

[学会発表](計 16 件)

木村博信、大谷淳二、川上徹、ジャファル・シャリフ、古関明彦、白川昌宏、末武勲、田嶋正二：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, 奈良

ロナルド G. ガルビレス、長谷川貴志、木村博信、ジャファル シャリフ、古関明彦、末武勲、田嶋正二：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, 奈良

堀居拓郎、森田純代、木村美香、田村大樹、小林遼平、山崎美帆、家坂直子、高橋陵宇、木村博信、末武勲、大畑広和、岡本康司、田嶋正二、落谷孝広、峯岸敬、伊藤理廣、安部由美子、畑田出穂：小分子 RNA 配列と相補的な DNA を切断する CRISPR/Cas9 ヌクレアーゼを用いた高効率ゲノム編集 第 5 回日本 RNAi 研究会, 2013, 広島

堀居拓郎、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、高橋陵宇、木村博信、末武勲、大畑広和、岡本康司、田嶋正二、落谷孝広、安部由美子、畑田出穂：半数

体ES細胞とCRISPR/Casを用いた高効率ゲノム編集 第3回ゲノム編集研究会, 2013, 広島

Kimura, H., Suetake, I., Tooi, N., Kawakami, T., Thomoto, T., Aiba, K., Nakatsuji, N and Tajima S.: Relative positions of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at promoter correlate with the level of gene expression. International Symposium on Transcription and Metabolism, 2013, Awaji.

木村博信:細胞の形質を司るエピジェネティクス~DNAメチル化から考える~ 第18回関西大学先端科学技術シンポジウム, 2014年1月, 大阪

木村博信, 末武 勲, 遠井紀江, 川上 徹, 饗庭一博, 中辻憲夫, 田嶋正二: 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, 東京

ロナルド・G・ガルピレス, 木村 博信, アーメット・キャン・ベルキュレック, 末武 勲, 田嶋 正二: 遺伝性知覚神経疾患の原因となる Dnmt1 の RFTS 内の変異が DNA 維持メチル化に及ぼす影響 第8回日本エピジェネティクス研究会年会, 2014, 東京

堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 小林遼平, 田村大樹, 高橋陵宇, 木村博信, 末武勲, 大畑広和, 岡本康司, 田嶋正二, 落谷孝広, 安部由美子, 畑田出穂: マウス半数体 ES 細胞と CRISPR/Cas9 法を用いた Tet1 ファミリーのゲノム編集 第8回日本エピジェネティクス研究会年会, 2014, 東京

首浦武作志, 岡野正樹, 木村博信, 田嶋正二, 多田政子: マウス ES 細胞における 5mC と 5hmC の連続変換によるメチル化制御 第8回日本エピジェネティクス研究会年会, 2014, 東京

首浦武作志, 木村博信, 田嶋正二, 多田政子: マウス ES 細胞での 5hmC 化を介した脱メチル化後の Dnmt1 の役割 第37回日本分子生物学会年会, 2014, 神奈川

堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 小林遼平, 田村大樹, 木村博信, 末武勲, 安部由美子, 畑田出穂: CRISPR/Cas 法による樹立した Tet トリプルノックアウト

ES 細胞の特性 第37回日本分子生物学会年会, 2014, 神奈川

木村博信, 堀居拓郎, 大谷順二, 末武 勲, 畑田出穂, 田嶋正二: 細胞周期阻害剤による 5hmC 産生機構の解明 第9回日本エピジェネティクス研究会年会, 2015, 東京

堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 小林遼平, 田村大樹, 木村博信, 末武勲, 田嶋正二, 安部由美子, 畑田出穂: ES 細胞の初期分化には Tet による *Nr2f2* プロモーター領域の脱メチル化が必要である 第9回日本エピジェネティクス研究会年会, 2015, 東京

首浦武作志, Aaron Bogutz, 木村博信, 田嶋正二, Louis Lefebvre, 多田政子: マウス ES 細胞の初期分化過程での Dnmt1 による新規 DNA メチル化獲得 第38回日本分子生物学会年会, 2015, 神戸

堀居拓郎, 森田純代, 木村美香, 寺脇直美, 小林遼平, 田村大樹, 木村博信, 末武勲, 田嶋正二, 安部由美子, 畑田出穂: Tet 遺伝子シングル, ダブルおよびトリプルノックアウト ES 細胞株の特性 第38回日本分子生物学会年会, 2015, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 博信(Hironobu Kimura)
大阪大学・たんぱく質研究所・助教
研究者番号: 60378891

(2) 連携研究者

田嶋 正二(Shoji Tajima)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号: 50132931