

哺乳類のエピジェネティクス研究 ゲノムの修飾を解析する新技術開発



山梨大学・生命環境学部・生命工学科 幸田 尚

【今後の展開 商品イメージ応用できる分野】

がんの診断などへの応用も期待される、ゲノムの修飾塩基メチルシトシン (mC)、ヒドロキシメチルシトシン (hmC) を同一分子上で同時に解析技術

1

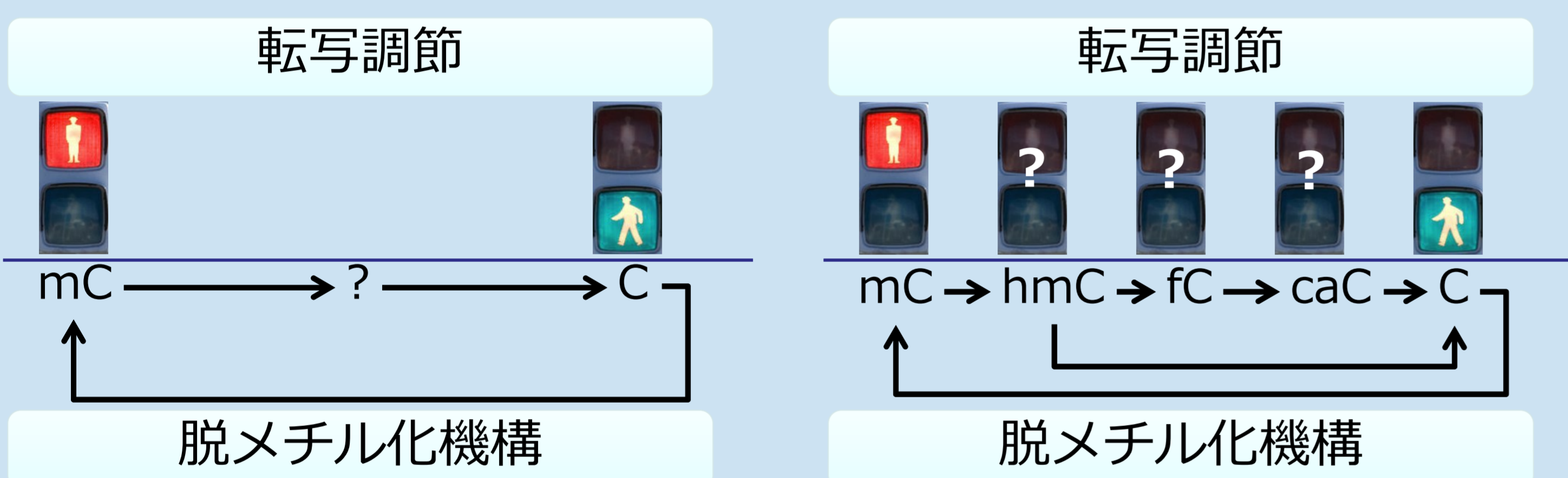
エピジェネティクスとは

- DNA一次配列の変化を伴わずに表現型に影響を与え、細胞に記憶されて伝達される可逆的な表現型の変化を研究する研究領域
- DNAのメチル化や様々なヒストン修飾などが細胞の「記憶」として細胞分裂や世代交代を経て次世代へと伝えられる。
- 我々は主にDNAのメチル化、ヒドロキシメチル化を中心として新規の解析技術の開発を行っている。

2

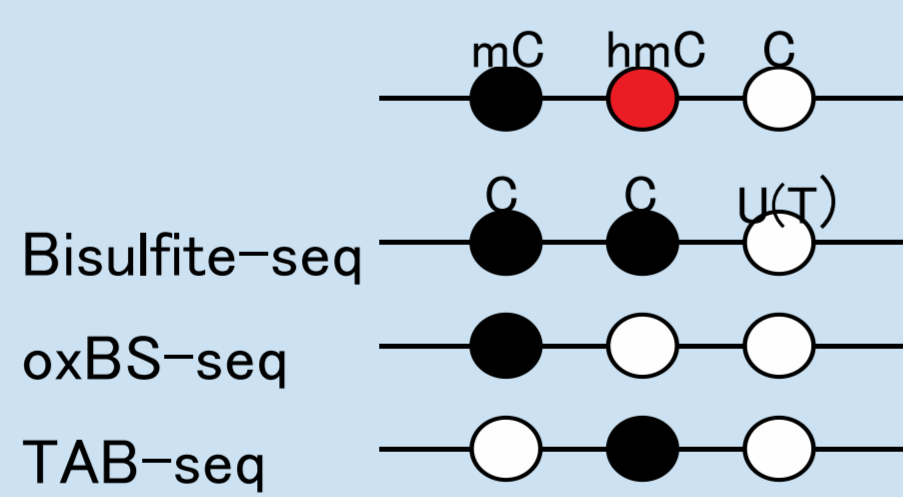
hmCが知られる以前の
エピゲノム研究

hmCなどの酸化的修飾塩基
発見以降のエピゲノム研究



哺乳類ゲノムDNAの修飾としてはシトシンのメチル化が主要なものとして知られており、メチル化の機構についても多くの研究が行われてきた。一方、一度メチル化されたシトシンの脱メチル化の機構については長らく不明であったが、近年メチルシトシン (mC) の酸化的修飾塩基であるヒドロキシメチルシトシン (hmC) をはじめとしてホルミルシトシン (fC)、カルボキシルシトシン (caC) などが脱メチル化の中間体として同定され、またこの反応を触媒するTET酵素群が見出されると、その重要性が注目されるようになった。

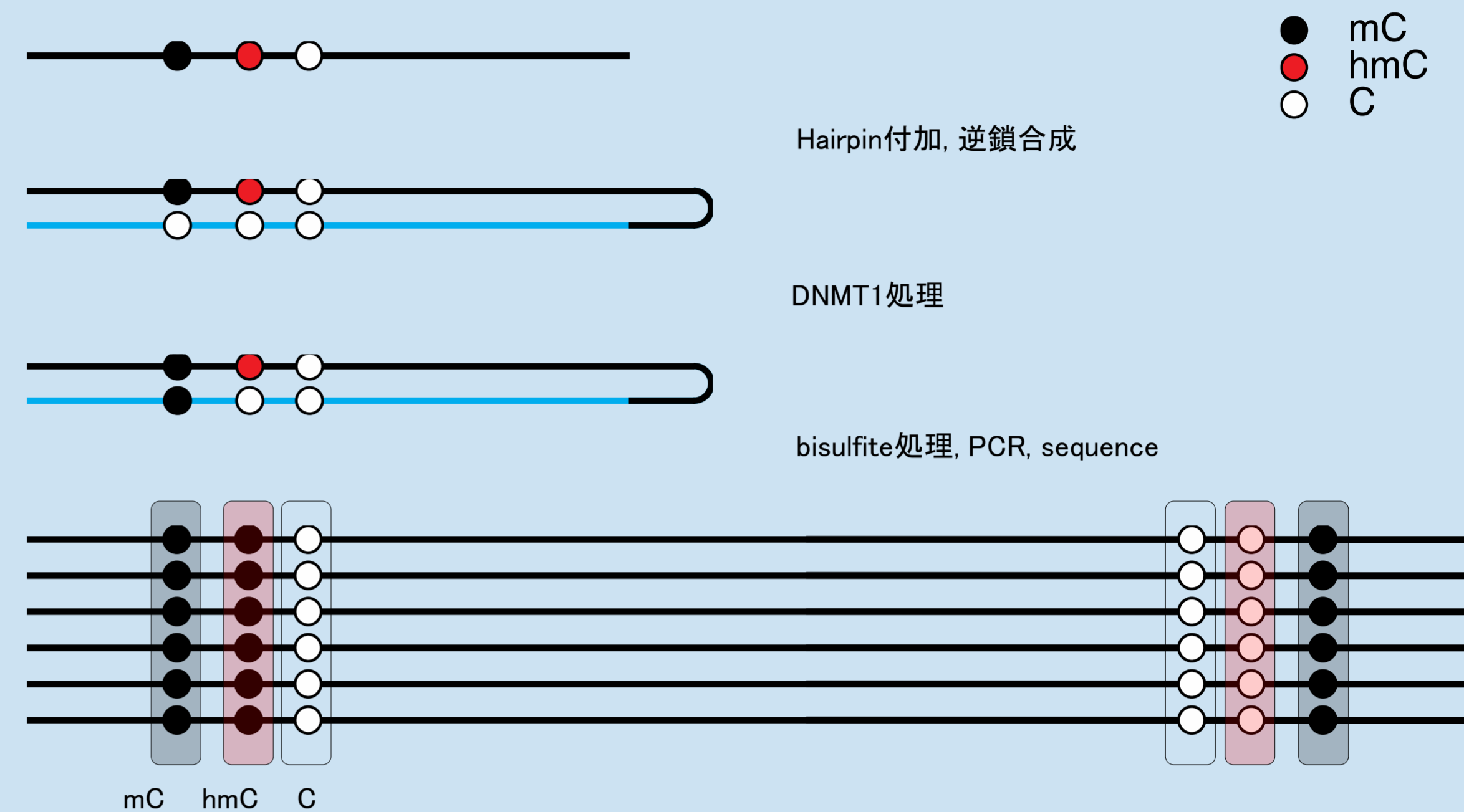
3



既存のmC、hmCの解析手法

これまでbisulfite-seqをはじめとして、mC、hmCの解析手法として、シトシンや修飾されたシトシンをウラシル(U)に変換することで、シトシンの修飾状態を同定する手法が様々な提案されてきた。しかしながら、同一分子上で非修飾のシトシン(C)とmC、hmCを同時に区別して同定する手法は開発されてこなかった。そこで我々はこれらを同時に解析できる新しい手法を開発し、EnIGMA法 (Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay) と名付けた。

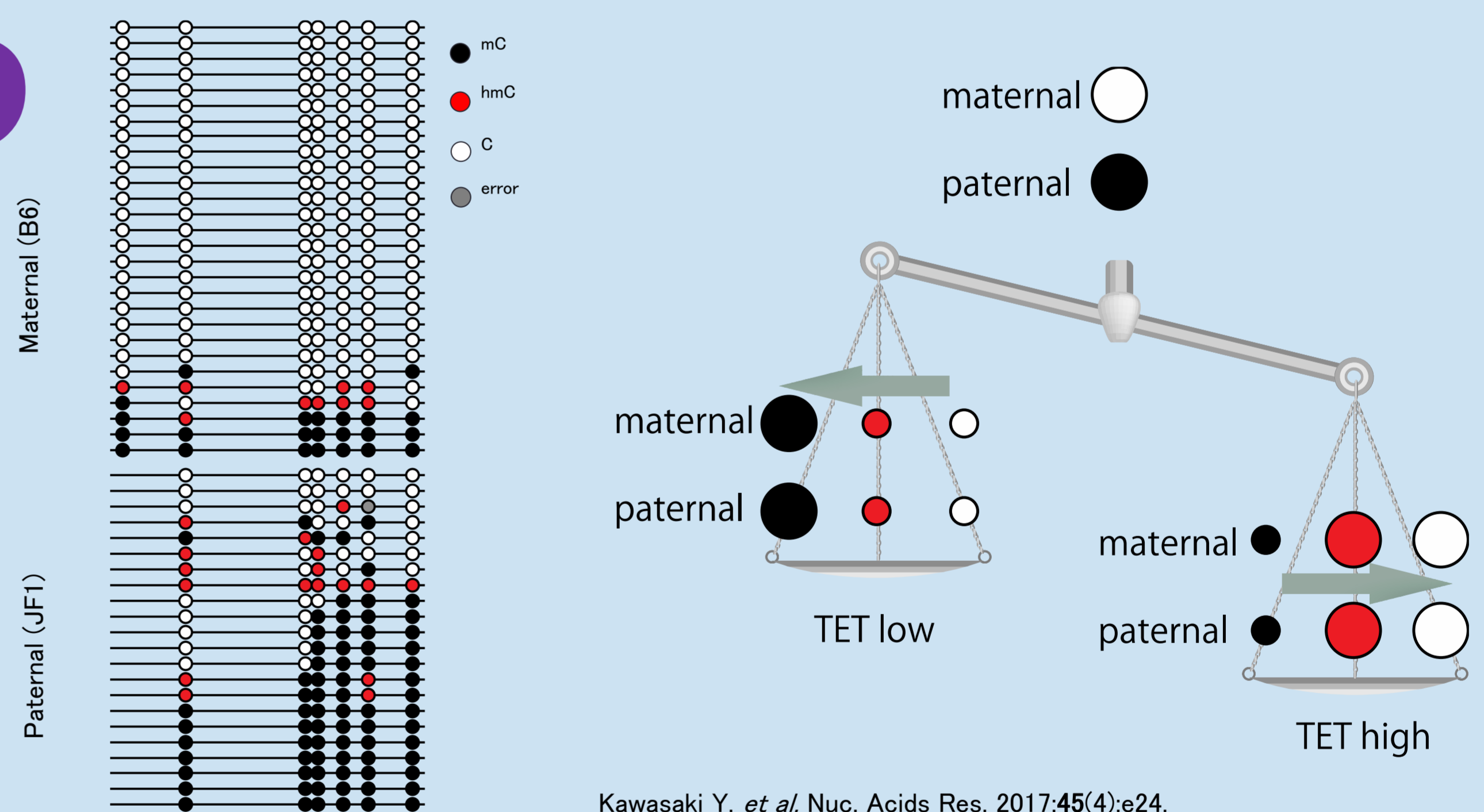
4



EnIGMA法の概要

この手法では解析したいDNAにヘアピン状のアダプターDNAを付加したのち、逆鎖のDNAを試験管内で合成する。合成された逆鎖のDNAのシトシンには修飾はない状態であるが、これをDNMT1というシトシンメチル化酵素で処理すると、CpG配列のうちmCの逆鎖のみメチル化し、hmCやCの逆鎖はメチル化しないという特異性があるため、この後長いヘアピン状のDNAを変性しbisulfite処理を行った後、PCR増幅、シーケンスを行って、元のDNA配列部分と逆鎖部分の配列を比較することでmC、hmC、Cの修飾状態を同時に知ることができる。また、bisulfite法による解析では、たまたまシトシンがチミンに変異したような多型がある場合、その部分が非修飾のシトシンのためTに変換されたのか、元々多型のためにTであったのかを区別するためには、何も処理をしないゲノムDNAのシーケンスを行わないと区別することができなかったが、EnIGMA法では元のDNA配列も同時に知ることができるため、多型との区別も同時に解析することができるメリットもある。

5



マウスES細胞ゲノムのH10 DMR領域のEnIGMA法による解析

それぞれの修飾状態を持つ合成DNAを用いて作成したモデル基質を使って同定の効率を検定した結果、EnIGMA法によって95%以上の精度でそれぞれの修飾状態を同定・定量できることが明らかになった。そこで実際にマウスのES細胞を用いて、H19-DMR領域のシトシン修飾状態をEnIGMA法によって解析した。H19遺伝子は片親性発現を示すインプリンティング遺伝子であるため、H19-DMRは母親由来のアレルは非メチル化状態に、父親由来のアレルはメチル化状態にあると考えられてきた。実際、ES細胞で解析してみるとどちらのアレルでもhmCが認められ、母親由来のアレルではメチル化されたものをTet酵素が酸化して脱メチル化状態を維持していると考えられ、一方で父親由来のアレルでは本来メチル化されている部分をTet酵素が脱メチル化してしまっていることが明らかとなった。従って、ES細胞においてはエピジェネティックな修飾状態を維持するためにはTet酵素の適切な活性が重要であることが示唆された。

EnIGMA法はこれまで不可能だったmCとhmCの同定、配列の変異同定の同時解析を可能とする新しい手法として確立された。次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドの解析も可能としている。現在はさらに解析精度の向上を図るべく技術改良を行なっている。この技術は基礎生物学的な解析技術としてだけでなく、がんの診断などに重要とされているcfDNAの解析をはじめとして様々な応用が可能な技術である。

他にも以下のような研究を行っています。

- 次世代シーケンサーを駆使した新しい解析技術の開発
 - ES細胞においてゲノム編集を用いた染色体工学
 - 哺乳類の胎生・胎盤の形成についての研究
- また、生命工学科ではバイオ・メディカルデータサイエンス特別コースを設置
(生命科学分野のデータサイエンス教育 ロボットを用いた実験の自動化 電子実験ノートの活用なども行なっている)