

CpGマイクロアレイを用いたヒストン修飾と遺伝子発現に関する研究

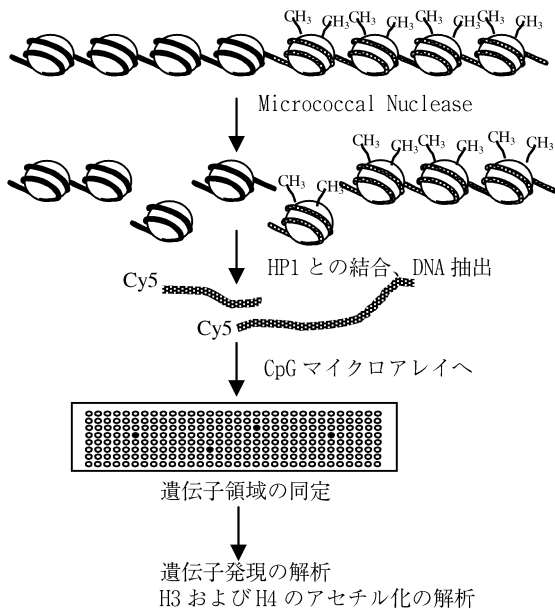
●山本 健

九州大学生体防御医学研究所

＜研究の目的と進め方＞

遺伝子の転写制御にはクロマチン構造の変化が伴い、それをもたらす分子機序の一つは、ヌクレオソームヒストンの化学的修飾である。これまでの研究では、個々の遺伝子のヌクレオソームヒストンに焦点をあて、化学的修飾と転写制御との関連が解析され、例えばヒストンH3リジン9 (H3-K9) がメチル化を受けると転写が抑制される、というような法則が成立しつつあるが、細胞機能発現における転写制御ネットワークの複雑性に鑑みれば、ヌクレオソームヒストンのいくつかの修飾と遺伝子発現との関連を包括的に解析する研究が重要となる。

本研究では、ヒトのCpGマイクロアレイを作製し、これを用いてH3-K9がメチル化を受けた遺伝子を網羅的に同定し発現との関連を解析する。さらにこれらの遺伝子についてヒストンH3,H4のアセチル化を検討し、2つの代表的なヒストン修飾と発現についての関連を解明する。そのために、①CpGマイクロアレイの作成、②メチル化H3-K9を有するヌクレオソームの精製とゲノムDNAの単離、アレイ解析、③遺伝子群の同定と発現の検討、④アセチル化H3,H4の有無の検討を順次推し進める。



＜研究開始時の研究計画＞

1) CpGマイクロアレイの作成

英国のBird博士らは、マウスおよびヒトのゲノムDNAから、MeCPタンパクのMBDを用いて、主として遺伝子プロモーター領域を含む平均約1 KbのゲノムDNA断片を精製しライブラリーを作製した。このライブラリーを用いて、約2万個のクローンからPCRによって挿入ゲノムDNA断片を増幅・精製し、CpGマイクロアレイを作成する。

2) メチル化H3-K9を有するヌクレオソームの精製とゲノムDNAの単離、アレイ解析

ゲノムDNAの単離、アレイ解析

メチル化H3-K9は、ヘテロクロマチンタンパクHP1のクロモドメインと特異的に結合する。HP1はヒストン脱アセチル化酵素や他の転写制御因子と結合することによって転写を抑制する。H3-K9がメチル化されたヌクレオソームを単離するにあたり、抗メチル化H3-K9抗体を用いる方法も考えられるが、HP1と機能的に結合が可能なヌクレオソームを単離することが重要と考えられるため、大腸菌で作製したGST-HP1を抗体の代わりに用いる。血清飢餓状態のHela細胞をMNaseによって部分消化し得られた核抽出液より、GST-HP1およびメチル化H3-K9との結合能を欠くGST-HP1CDmut (コントロール)を用いて、メチル化H3-K9を有するオリゴヌクレオソームを精製する。このヌクレオソームプルダウンを複数回行いプールを作成した後、これよりゲノムDNA断片を抽出し、CpGマイクロアレイのプロープとして用いる。アレイ解析によって得られる陽性スポットについて塩基配列解析を実施し、H3-K9がメチル化された遺伝子領域を同定する。さらに、TPAおよび血清添加後のHela細胞より、経時的に上記と同様の方法でHP1と結合するオリゴヌクレオソームを精製し、当初得られる遺伝子群におけるH3-K9のメチル化の変化と発現変化との関連を順次解析する。

3) H3-K9がメチル化を受けた遺伝子における遺伝子発現とH3,H4アセチル化との関連の解析

H3-K9がメチル化されているにもかかわらず発現を認める遺伝子については、発現を活性化させるヒストン修飾であるH3およびH4のアセチル化に焦点をあて、上記の細胞刺激系において、ヌクレオソームを精製後、抗ヒストンH3アセチル化抗体および抗ヒストンH4アセチル化抗体を用いてクロマチン免疫沈降を実施し、H3-K9のメチル化と合わせ遺伝子発現制御との関連を総合的に解析する。

＜研究期間の成果＞

1) CpGマイクロアレイの作成

平成15年度に2万スポット (Duplicateで作成。合計約4万スポット) を有するCpGマイクロアレイを作成し準備した。

2) メチル化H3-K9を有するヌクレオソームの精製とゲノムDNAの単離、アレイ解析

Hela細胞をMNaseによって部分消化し得られた核抽出液より、GST-HP1およびメチル化H3-K9との結合能を欠くGST-HP1CDmut (コントロール)を用いて、メチル化H3-K9を有するオリゴヌクレオソームを精製した。これよりゲノムDNA断片を抽出して、CpGマイクロアレイのプロープとして用いた。アレイ解析の結果、再現性を認める547陽性スポットを得た。これらの大部分は非遺伝子領域のゲノムに相当したが、91個は遺伝子領域を含んでいた。これら92個の遺伝子発現を検討したところ、60個の遺伝子において明らかな発現を認めた。これまでH3-K9のメチル化は発現抑制をもたらすと考えられていたが、必ずしもそうではないことが示された。一方、遺伝

子発現とH3-K9メチル化の変化を関連付けながら解析する予定であったが、H3-K9メチル化遺伝子の多くで発現を認めたため、両者の動的変化を検討する実験系を組むことが困難となった。

3)H3-K9がメチル化を受けた遺伝子における遺伝子発現とH3,H4アセチル化との関連の解析

2)の実験系において同定した91個の遺伝子において遺伝子発現を正に制御するH3,H4のアセチル化についてCHIPアッセイにて解析した。83個の遺伝子においてデータを取得し、以下の結果を得た。1)発現を認めた遺伝子(57個)のうち47個はアセチル化を受けていた(82%)、2)発現のない遺伝子(26個)においてはすべてアセチル化を受けていなかった。3)アセチル化を受けている遺伝子はすべて発現を認めた。4)アセチル化を受けていない遺伝子(36個)においても10個で発現を認めた(27.5%)。

以上のことから、1)H3-K9のメチル化と転写抑制との相関は認められない、2)H3、H4のアセチル化と遺伝子発現には従来知られていたような正の関連が認められる、3)遺伝子発現においてH3、H4のアセチル化はH3のメチル化に対して優位に機能する、4)H3-K9のメチル化に対してH3,H4のアセチル化以外に優位に機能して、遺伝子発現を導くヒストン修飾の存在、などが示唆された。

〈国内外での成果の位置づけ〉

これまで個々の遺伝子に注目してヒストン修飾と発現について検討した研究は数多くあるが、多くの遺伝子を同時に解析した例は無かった。特に、H3-K9メチル化は発現抑制と密接に関連するとされていたが、本研究において両者の関連は一般化できないことが示された。さらに、遺伝子発現についてはH3,H4のアセチル化がH3-K9メチル化に対して優位に機能することは新しい知見と考えられる。またゲノム解析機器の進展により、ゲノムの広い領域をオリゴアレイによってカバーし、クロマチン免疫沈降によって包括的にヒストン修飾を解析する研究が、研究期間中に発表された。ゲノムを高分解度で解析できる点においては、本研究における研究方法よりも優れていることは否定できないが、本研究においてはH3-K9メチル化ヌクレオソームを、抗体ではなく非常に特異性の高い結合分子(HP1分子)を用いて直接精製しており、より特異性の高いゲノムDNA断片を用いた。内外においてこのような研究は認められず、上記結果も含めこの点においても新規性を有すると考える。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1)CpGマイクロアレイについて

予想以上にRedundantなクローンが多く、アレイ解析で陽性になったものについてかなりの数の重複が見られ、予想を下回る遺伝子数しか得られなかった。また、遺伝子プロモーター領域を主として含むライブラリーではあったが、遺伝子間領域のゲノム断片も多く認められ、これも上記の原因となった。すべてのクローンをあらかじめ塩基配列解析し、遺伝子プロモーター領域を含む断片のみをスポットすることが出来れば、より高度なアレイを作成することが可能であったが、現実的には数万クロンの塩基配列は実施不可能であったため、作成し得なかった。このように、研究を進める上で、少なからずアレイ自体に限界があった。

2)発現の動的変化とH3-K9メチル化との関連について

当初の大きな研究目的は、H3-K9のメチル化が、遺伝子発現が変動していく中で、どのように変化していくのか、それを多数の遺伝子を解析することによって明確に

することであった。しかしながら、少なくとも本研究で用いたCpGマイクロアレイによって同定し、クロマチン免疫沈降によっても確認した、H3-K9メチル化遺伝子群の約6割に遺伝子発現を認めたこと、さらに、大きく遺伝子発現が変動すると考えられたTPA刺激において、H3-K9メチル化遺伝子群に発現変化を認めなかったこと、などの理由により当初目的が達成できなかった。しかし、H3-K9メチル化遺伝子群の約6割に遺伝子発現を認めたことはこれまでの知見とは異なっており、遺伝子発現に関してH3-K9メチル化より優位に機能するヒストン修飾が存在する可能性を示すことができた。

〈今後の課題〉

種々のヒストン修飾の変化と遺伝子発現の変動を多数の遺伝子について解析し、その一般即を同定するためには以下の2点が課題と考えられる。

1)特異性の高いクロマチンの精製

現在の研究状況は、ヒストンの修飾に応じて特異的な抗体を用いクロマチンを精製している。しかし、実際は非特異的な免疫沈降物もかなり混在し、受け皿であるマイクロアレイやPCR反応をより高分解度のものにしても、不明確なデータを含む危険性が高い。本研究ではHP1分子を用いてより確かなH3-K9メチル化ヌクレオソームを精製したが、各種の修飾について、このような精製法が望まれる。全ての修飾について特異的な結合分子は存在しないので、抗体を用いる精製法の改善が最も現実的であるが、これについて研究者は、磁気ビーズと抗体、そして固定化しない細胞より得たヌクレオソームを用いた精製法を考案し、研究を進めている。

2)マイクロアレイ

多数の遺伝子について、それぞれの遺伝子に特異的な配列を有する、プロモーター領域およびエクソン部分を含む高分解度のアレイを用いることによって、本研究よりも多くの遺伝子について、遺伝子領域のヒストン修飾がより正確に同定される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

0404091730

Yamamoto, K., and Sonoda, M. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 287-292 (2003)

0404091814

Yamamoto, K., Sonoda, M., Inokuchi, J., Shirasawa, S., and Sasazuki, T. Polycomb group suppressor of zeste 12 links heterochromatin protein 1 alpha and enhancer of zeste 2 *J. Biol. Chem.* 279, 401-406 (2004)