

脱メチル化ターゲット配列データベースの作成と共通モチーフの解明

●畑田 出穂 ◆堀居 拓郎

群馬大学生体調節研究所附属生体情報ゲノムリソースセンター

<研究の目的と進め方>

遺伝子の発現制御においてDNAのメチル化(シトシン塩基のメチル化)は重要な役割をはたしており、プロモーター領域がメチル化されると遺伝子の発現は抑制される。このようなエピジェネティックな制御機構は分化、発生をはじめ様々な生命現象における発現制御において重要な働きをなしている。例えば未分化細胞における重要な転写因子のOct-4, Nanogなどの遺伝子が、初期発生の分化にともないDNAのメチル化がおこり不活性化されるのはその例の一つである。その後、これらの遺伝子がリプログラミングによる体細胞からのiPS細胞の作成に必要なものであることがわかったのは記憶に新しいところである。そこで分化、あるいは分化のリプログラミングをさらに深く知るにはDNAのメチル化あるいは脱メチル化の機構を研究していく必要がある。

そこで我々はDNAのメチル化を網羅的に解析する方法を開発しそれを用いてメチル化あるいは脱メチル化される配列や遺伝子の特徴を探ることをおこなっている。

申請者はこれまでにMicroarray-based Integrated Analysis by Isoschizomer (MIAMI)法(<http://grc.dept.med.gunma-u.ac.jp/~gene/>)というマイクロアレイによりゲノムワイドに遺伝子のプロモーター領域のメチル化を調べる技術を独自に開発してきた。これまでのメチル化アレイではメチル化に起因する制限酵素認識部位の切れ方の違いだけでなく、サンプル間の制限酵素認識部位の多型や、DNA品質の違いなどによる制限酵素による切れ方の違いを、あたかもメチル化の差として検出してしまう可能性があった。そこでMIAMI法ではメチル化感受性酵素(*Hpa* II)による切れ方の差だけではなく、同じ認識部位を切断するメチル化非感受性酵素(*Msp* I)による切れ方の差を検出し、その両者を比較してメチル化に起因するサンプル間の差とする。*Hpa* IIで差があり、*Msp* Iで差がなければメチル化がサンプル間で異なると判定する。また*Hpa* II、*Msp* I両方で同程度の差があればこれはメチル化以外の差でありメチル化は差なしと判定する。

このようにして共通する特徴を明らかにすることは将来的にはメチル化、脱メチル化の人工的制御による再生医療や癌の分子治療薬の開発につながると考えられる。

そこでこのプロジェクトでは様々な細胞の分化においてメチル化、脱メチル化する遺伝子のデータベースを作成し、変化のなかった遺伝子群と比較して、その特徴の解析をおこなう。

<研究開始時の研究計画>

ゲノムワイドなDNAメチル化プロファイリング法であるMIAMI法を用いて神経幹細胞などの分化におけるメチル化の変化する配列のプロファイリングをおこなう。そしてデータベースを作成し、変化のなかった遺伝子群と比較して、その特徴の解析をおこなう。

<研究期間の成果>

神経幹細胞の分化系を用いてゲノムワイドなメチル化の解析を

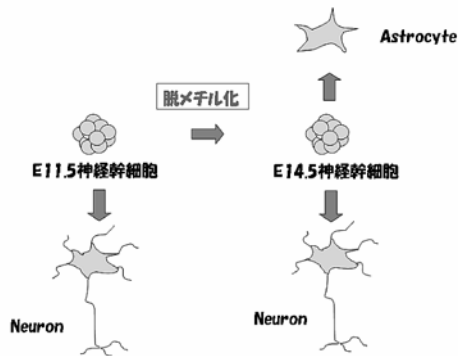
おこなった。マウスの11.5日胚からとりだした神経幹細胞は神経にしか分化することはできない。それに対し14.5日胚からとりだした神経幹細胞は神経にもアストロサイトにも分化することができる。一見同じようにみえる神経幹細胞にこのような違いがみられるのはエピジェネティックな違いであると考えられる。その根拠はGfapというアストロサイトの分化マーカー遺伝子はSTAT3という転写因子により活性化されることが知られているが、11.5日胚由来の神経幹細胞ではGfap遺伝子におけるSTAT3の結合サイトがメチル化されているのに対し、14.5日胚では脱メチル化されていることがわかっているからである(図)。そこで我々は、Gfap以外の遺伝子においても同様にアストロサイトの分化に必要な遺伝子の脱メチル化が起こっているのではないかと考え、ゲノムワイドなメチル化のプロファイリングをおこなった。その結果、14.5日胚由来の神経幹細胞では11.5日胚由来の神経幹細胞と比較し脱メチル化がおこっている遺伝子が多くあることがわかった。これらの遺伝子の多くはアストロサイトにおいても脱メチル化されて発現が誘導されており、ゲノムワイドな脱メチル化はアストロサイトの分化に重要な働きをしていることがわかった。しかしながらこれらの遺伝子のオントロジーの解析をおこなったところ強い特徴はなかった。また保存されたSTAT3の結合配列もみられなかった。一方、14.5日胚由来の神経幹細胞においてメチル化される遺伝子はほとんどなかったが、最終的に分化したアストロサイトにおいてはメチル化される遺伝子が多く見られた。またおもしろいことにこれらの遺伝子のオントロジーの解析をおこなったところ発生、転写関連遺伝子が多いことがわかった。これは分化が終わった細胞においては分化に必要な遺伝子が不活性化し、細胞の分化状態を安定化しているのではないかと推測される。またこれまでの癌などのゲノムワイドなプロファイリングにおいてメチル化されている遺伝子においてやはり発生、転写関連が多かったことから、発生、転写関連遺伝子がDe novoのメチル化のターゲットとなっているのではないかと考えた。そこでDe novoのメチル化酵素の1つであるDnmt3aのノックアウトマウスで脱メチル化されている遺伝子、つまりDnmt3aによりメチル化される遺伝子をゲノムワイドにプロファイリングしたところ発生、転写関連遺伝子が多いことがわかり、我々の推測が正しいことが証明された。

<国内外での成果の位置づけ>

これまで神経幹細胞のゲノムワイドなメチル化の解析はおこなわれておらず11.5日胚由来と14.5日胚由来の神経幹細胞のエピジェネティックな差、つまりゲノムワイドなDNAの脱メチル化を明らかにしたことは、神経分化とエピジェネティクスの研究分野において重要な発見であると考えられる。またメチル化される遺伝子に発生、転写関連遺伝子が多く、しかもDnmt3aのターゲットとなっていることがわかったことは、ゲノムワイドな解析の重要性を証明し、今後このような手法におけるアプローチの将来性を示唆している。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

予想に反し、神経幹細胞で脱メチル化される配列には特徴がみられず、STAT3の結合配列もみられなかった。つまり脱メチル化によるSTAT3の結合によるアストロサイト分化の促進という、Gfapにおいてこれまで考えられていた単純なモデルが一般化できないことがわかったわけである。生物はそんなに単純にはできていないと考えられる。それに反しメチル化される遺伝子において特徴をみいだすことができた。



<今後の課題、展望>

今後、さらに様々な生命現象においてゲノムワイドなメチル化の解析を広げ、一般化をおこなっていく必要がある。またデータの蓄積とデータベース化をおこなっていく予定である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1. 705021622 (論文)

Hatada I, Emerging Technologies for Genome-wide DNA Methylation Profiling in Cancer., Crit Rev Oncog., 12, 205-223(2006)

2. 705021624 (著書)

Hatada I, Genomic-wide DNA Methylation Profiling Methods-From RLGS to MIAMI, Progress in DNA Methylation Research, Nova Publishers, 2007

3. 801271614 (論文)

Nomura T, Kimura M, Horii T, Morita S, Soejima H, Kudo S, Hatada I, MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization., Hum Mol Genet, 2008 Jan 18; [Epub ahead of print]

4. 801271617 (論文)

Hatada I, Morita S, Kimura M, Horii T, Yamashita R, Nakai K, Genome-wide demethylation during neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells., J Hum Genet., 2008 Jan 17; [Epub ahead of print]

5. 801271622 (論文)

Horii T, Kimura M, Morita S, Nagao Y, Hatada I., Loss of genomic imprinting in mouse parthenogenetic embryonic stem cells. Stem Cells., 2008 Jan;26(1):79-88.