

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510266

研究課題名(和文) 配列依存性的アレルト異的ヒドロキシメチル化の探索

研究課題名(英文) Search for sequence-dependent allele-specific hydroxymethylation

研究代表者

山田 洋一(yamada, yoichi)

金沢大学・電子情報学系・准教授

研究者番号：30377402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、配列依存性的アレルト異的メチル化の存在を世界に先駆けて報告し、多型配列が引き起こす各種疾患感受性差異の作用機序をゲノムメチル化の有無が導く遺伝子発現差異を通して理解可能なことを示した。一方、近年ヒドロキシメチル化がゲノム上からの脱メチル化過程で重要な役割を担っていることや、遺伝子発現調節にも関与していることが示唆されている。そこで本研究では、マウスの6個の既知の配列依存性的アレルト異的メチル化領域が配列依存性的アレルト異的ヒドロキシメチル化を受けているか否かを調べた。結果としてこのうちの一つが配列依存性的アレルト異的ヒドロキシメチル化を受けていることが示された。

研究成果の概要(英文)：The research representative previously reported a sequence-dependent allele-specific methylation. This enabled us to interpret the mechanism of various disease susceptibility caused by sequence polymorphisms through gene expression differences caused by the presence or absence of genomic methylation at a polymorphic site. On the other hand, genomic hydroxymethylation plays an important role in the demethylation process. Furthermore, it is suggested that genomic hydroxymethylation is also involved in gene expression regulation. In this study, we examined whether the six known sequence-dependent allele-specific methylation regions in mouse are subject to a sequence-dependent allele-specific hydroxymethylation. As a result, it was shown that one of the six was subject to a sequence-dependent allele-specific hydroxymethylation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：ヒドロキシメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞中に存在する CpG メチラーゼと呼ばれる酵素は、ゲノム上の殆どの CpG 配列のシトシン塩基にメチル基を付加(メチル化)する。この例外は、ヒトの約半数の遺伝子転写制御領域(プロモータ)に存在する CpG 配列に富んだ CpG island (CGI) である。CGI 上の CpG ジヌクレオチド配列は通常、すべての発生段階及び成体組織においてメチル化から免れている。しかしながら、由来する親の性別に依存して一方のアレルのみが発現するインプリント遺伝子の近傍と X 染色体上に存在する CGI はこの例外であり、アレル特異的なメチル化を受けている。

また近年 Tet 酵素によるシトシン塩基に付加されたメチル基のヒドロキシル化(ヒドロキシメチル化)がゲノムからの脱メチル化過程や遺伝子発現調節に関わっていることが示唆されており、大きな注目を集めているがその詳細は未だ不明である。

メチル化は、個々の遺伝子の発生段階・各組織特異的な機能発現制御、ゲノム刷り込み現象、雌における X 染色体不活化、そしてゲノムに侵入したウイルスの不活性化による生体防御など、哺乳類の生命維持に不可欠である。しかしながらこれまで、何故特定の DNA 配列上にはメチル基が付加され、他の領域には付加されないのかというメチル基付加の有無とその配列依存性間の詳細については殆どわかっていなかった。

一方、研究代表者は、ゲノム配列情報に基づいたメチル化解析技術である HpaII-McrBC PCR (HM-PCR) 法を独自に考案し、ヒト 21 番及び 11 番染色体上の CGI のアレル別のメチル化状態を網羅的に調べ、配列に依存したアレル特異的なメチル化を世界に先駆けて同定した (Yamada et al., *Genome Res.*, 2004; Yamada et al., *DNA Seq.*, 2006)。これは図 1 に示すように、アレル特異的なメチル基付加の有無がアレル間

のごくわずかな配列の違いに依存していることを示しており、そのメカニズムの解明からメチル基付加の有無と DNA 配列特徴間の関連性が明らかになることが期待されている。図 1 では、白丸が非メチル化 CpG を黒丸がメチル化 mCpG をそれぞれ示しており、アレル A-B 間の配列の違いに依存してプロモータ領域にメチル基が付加され、結果として配列差異に依存したアレル特異的な遺伝子発現がもたらされるというものである。

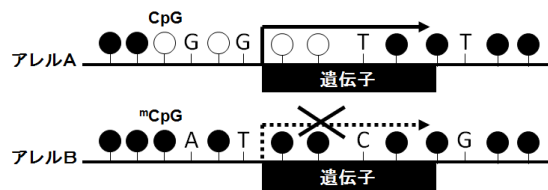


図 1: 配列依存性的アレル特異的なメチル化

また研究代表者が配列依存性的アレル特異的なメチル化を報告した後、海外の複数の研究グループにより、配列依存性的アレル特異的なメチル化が、ヒト及びマウスゲノム上において普遍的に存在することが報告された (Kerkel et al., *Nat. Genet.*, 2008; Schilling et al., *Genome Res.*, 2009; Wei et al., *Cell*, 2012)。またこれらの一部が、図 1 におけるアレル A のホモでは両アレルともメチル化されず、アレル B のホモでは両アレルともメチル化されることや、これが同様に配列依存性的な遺伝子発現にも寄与していることが示され、現在、多型配列が引き起こす各種疾患感受性差異のメカニズムを、配列依存性的アレル特異的なメチル化により引き起こされる遺伝子発現差異を通して理解できるのではないかと期待されている。また実際に、FTO (fat mass and obesity associated) Type 2 糖尿病・肥満では、疾患感受性ハプロタイプ特異的なメチル化が既に報告されている (Christopher et al., *PLoS One*, 2010)。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、配列依存的アレル特異的メチル化の存在を世界に先駆けて報告し、多型配列が引き起こす各種疾患感受性差異の作用機序をゲノムメチル化の有無が導く遺伝子発現差異を通して理解可能なことを示した。しかしながらこれらの配列依存的アレル特異的メチル化がメチル化なのかヒドロキシメチル化なのかは現在のところ不明である。そこで本研究では、新たに配列依存的アレル特異的ヒドロキシメチル化および、それによって引き起こされる配列依存的アレル特異的遺伝子を同定し、同様に各種多型が導く疾患感受性差異の作用機序解明に貢献することを目的とした。

## 3. 研究の方法

国立遺伝学研究所と金沢大学との間で MTA ( MATERIAL TRANSFER AGREEMENT ) を締結し ( No. S2014-002 )、国立遺伝学研究所より JF1 マウスを購入した。またアレルを区別するために、互いに垂種関係にあり多くの多型を有する上記 JF1 マウスと B6 マウスを相互に掛け合わせた JF1/B6 マウスと B6/JF1 マウスをそれぞれ作製し、これらの各組織由来のゲノムを抽出した。

次に、Schilling らにより同定された 6 個の既知の配列依存的アレル特異的メチル化領域 ( Schilling et al., Genome Res., 2009 ) をウェブ上から取得した。

JF1 と B6 間の多型データベース (<http://molossinus.lab.nig.ac.jp/msmdb/>) を用いて、上記の 6 個の配列依存的アレル特異的メチル化領域の周辺部位に JF1 と B6 マウス間の多型を同定し、これと制限酵素である MspI の認識サイトを 4 個以上アンプリコン内に含むプライマー対を設計した。

次に、JF1/B6 および B6/JF1 マウスの脳および精巣由来ゲノムに対し、T4-BGT 酵素処理後の MspI 消化をそれぞれ別々に行った。

この後、この切断済みゲノムを鋳型として、上記のプライマー対を用いて PCR 増幅を行い、増幅産物をダイレクトシーケンス法により配列決定した。

## 4. 研究成果

マウスの 6 個の既知の配列依存的アレル特異的メチル化領域が配列依存的アレル特異的ヒドロキシメチル化を受けているか否かを調べ、結果としてこのうちの一つが配列依存的アレル特異的ヒドロキシメチル化を受けていることを見出した。

## 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 2 件 )

Hiroki Miyahara, Osamu Hirose, Kenji Satou, Yoichi Yamada,  
Factors to preserve CpG-rich sequences in methylated CpG islands,  
BMC Genomics, 査読有, Vol.16:144,  
2015.  
doi:10.1186/s12864-015-1286-x

Kei Fukuda, Kenji Ichianagi, Yoichi Yamada, Yasuhiro Go, Toshifumi Udono, Seitaro Wada, Toshiyuki Maeda, Hidenobu Soejima, Naruya Saitou, Takashi Ito, Hiroyuki Sasaki,  
Regional DNA methylation differences between humans and chimpanzees are associated with genetic changes, transcriptional divergence and disease genes,  
Journal of Human Genetics, 査読有, Vol.58(7), pp.446-454, 2013.  
doi:10.1038/jhg.2013.55

〔その他〕

ホームページ等

<http://gie.ec.t.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

山田 洋一 (YAMADA, Yoichi)

金沢大学・理工研究域電子情報学系・准教授

研究者番号：30377402