

## 研 究 報 告 書

### 「Gene body メチル化の生物学的意義と分子機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: 鈴木 美穂

#### 1. 研究のねらい

DNAメチル化は、DNA分子に直接付加されるエピジェネティック修飾である。DNAメチル化は遺伝子発現を制御する重要な役割をもっており、哺乳類の正常な発生には不可欠である。DNAメチル化による遺伝子発現制御機構としてよく知られているのは、遺伝子の転写開始に関与する上流プロモーター領域のメチル化修飾である。プロモーターのDNAメチル化は、遺伝子の発現を強く抑制することができる。しかし近年の次世代シーケンサー技術によってゲノム全体のDNAメチル化パターンが詳細に解析されるようになると、「DNAメチル化はプロモーターより下流の遺伝子転写領域 (gene body) に集中している」ことが明らかになった。Gene body 領域を修飾するDNAメチル化の機能はどのようなものであろうか？ Gene body メチル化は、植物、無脊椎動物、脊椎動物のゲノムに存在することから、おそらく真核生物の進化を通して最も原始的かつ広く用いられている重要なメカニズムだと考えられる。本研究のねらいは、gene body メチル化のパターンが顕著な無脊椎動物カタユレイボヤを用いて、gene body メチル化の機能と分子機構を明らかにすることである。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

gene body メチル化の機能を明らかにするために、カタユレイボヤDNAメチル化修飾の組織による違いを詳細に解析した。DNAメチル化の高い組織(精子)と低い組織(成体筋肉)でゲノムワイドにDNAメチル化を調べたところ、修飾されている遺伝子に組織特異性はなく全く同一であることがわかった。また、修飾されている遺伝子群は、どのような組織でも恒常的に発現している遺伝子であった。次に、gene body メチル化パターンが構築される分子機構を明らかにするためにトランスジェニック遺伝子の解析を行い、gene body メチル化修飾の有無を決定する塩基配列がどこにあるかを調べた。解析の結果、恒常的に発現している遺伝子のプロモーターに、下流の遺伝子領域をメチル化する特性があることを明らかにした。

## (2) 詳細

### 1-1. 発生過程におけるメチル化レベルの変化

発生過程においてカタユウレイボヤのDNAメチル化修飾はどのように変化するだろうか？カタユウレイボヤのさまざまな初期発生ステージと成体組織からゲノムDNAを抽出し、ゲノム中に存在するDNAメチル化の総量の違いを調べた。すると、DNAメチル化は初期発生ステージを通して常に高いレベルでゲノムに存在し、哺乳類で見られるような受精後の脱メチル化は起こっていないことがわかった。また、成体組織のDNAメチル化レベルは内臓や生殖細胞では高く、筋肉を含む体壁組織では低くなっており、組織によって大きな差があることがわかった。



図1 脊索動物門 尾索動物亜門 カタユウレイボヤ

### 1-2. 精子と筋肉のメチル化パターンの比較

成体組織ではDNAメチル化レベルが大きく異なることがわかったので、DNAメチル化パターンをより詳細に解析した。均一な細胞からなる精子（高メチル化）と筋肉（低メチル化）を用いて、それぞれのDNAメチル化ターゲット領域をゲノムワイドに決定した。CXXC affinity purification (CAP)という方法で精子DNAの非メチル化領域のみを濃縮し、Illumina シークエンスでその塩基配列を決定した。筋肉は全ゲノムバイサルファイトシークエンス法で詳細なメチル化パターンを決定した。データ解析の結果、以下の事柄が明らかになった。

- ・gene body メチル化されている遺伝子は、精子と筋肉で同一である。全ゲノムメチル化解析実験の結果、精子と筋肉でメチル化状態が異なる遺伝子が全遺伝子の約 5%見つかったが、異なる実験法による確認によりこれらはすべて artifact (偽陽性)であることが示された。つまり、精子と筋肉でメチル化状態が変化する遺伝子は一つも発見されなかった。

- ・精子と筋肉のDNAメチル化レベルの差は、メチル化されている遺伝子群の違いではない。筋肉ではメチル化領域のメチル化レベルが精子と比べると低く、これがゲノム全体のメチル化レベルが低い原因である。DNAメチル化レベルとDNAメチル基転移酵素の発現量には相関がないが、メチル化遺伝子の発現量とは相関がある。

- ・精子と筋肉は発生過程において別々に分化した全く性質の異なる組織である。それぞれの組織で発現している遺伝子群は大きく異なるため、gene body メチル化は遺伝子の発現 ON/OFF を制御しているのではないということがわかった。

- ・これまでDNAメチル化は、細胞の分化にともなってダイナミックに変化し発生・分化を制御していると考えられてきたが、常に一定の遺伝子を修飾しているカタユウレイボヤの gene body メ

チル化には、分化で発現が変動する遺伝子の発現を制御するのとは異なる機能があるだろう。

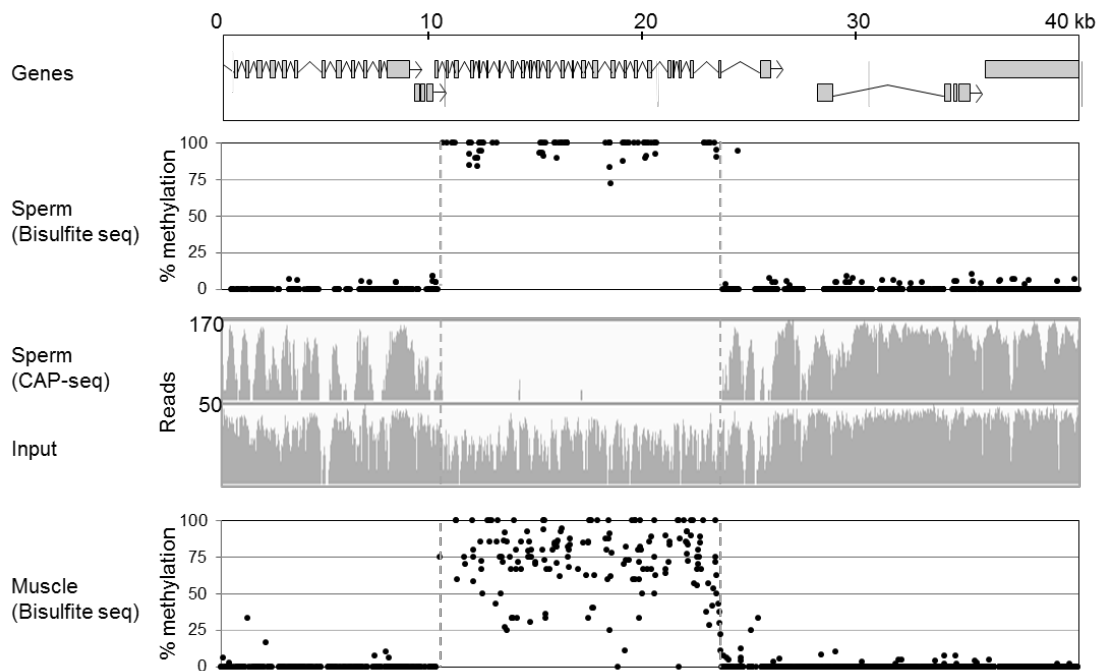


図2 精子と筋肉のメチル化パターンの比較

### 1-3.メチル化遺伝子の特徴

Gene body メチル化は遺伝子の発現 ON/OFF を制御しているのではない。では、どのような遺伝子がDNAメチル化されているのだろうか？ gene body メチル化されている遺伝子群の特徴を解析したところ、卵細胞に mRNA が蓄えられる母性遺伝子と、すべての細胞で発現している遺伝子が多く含まれていた。つまり常に発現し細胞が必要とする必須タンパク質をつくっている遺伝子は gene body メチル化修飾されており、反対に時期・組織特異的な発現を示す遺伝子は gene body メチル化されていないという結論を得た。

### 2.トランスジェニック動物ゲノムを用いた gene body メチル化構築の解析

Gene body メチル化パターンは遺伝子の発現様式(常に発現しているか、時期・組織特異的か)に関連していることがわかった。遺伝子の発現様式は、通常それぞれの遺伝子上流プロモーターの特性によって決められている。そこで、遺伝子が gene body メチル化修飾を受けるかどうか、DNAメチル化修飾を受けた転写環境を構築するかどうかプロモーターによって決められているという仮説を立てた。常に発現している遺伝子のプロモーターの下流に GFP をつないだ外来遺伝子をゲノムに挿入したトランスジェニックカタウレイボヤを解析したところ、GFP の gene body 領域に新規の gene body メチル化が入っていることが示された。しかし、組織特異的な発現を示す遺伝子のプロモーターの下流に GFP をつないだ外来遺伝子を用いた場合では、トランスジェニックカタウレイボヤのゲノムに挿入されたあと、GFP が gene body メチル化修飾を受けることはなかった。この結果から、gene body メチル化状態はメチル化を受ける gene body 領域の塩基配列ではなく、上流プロモーターによって決定される機構であることがわかった。

た。

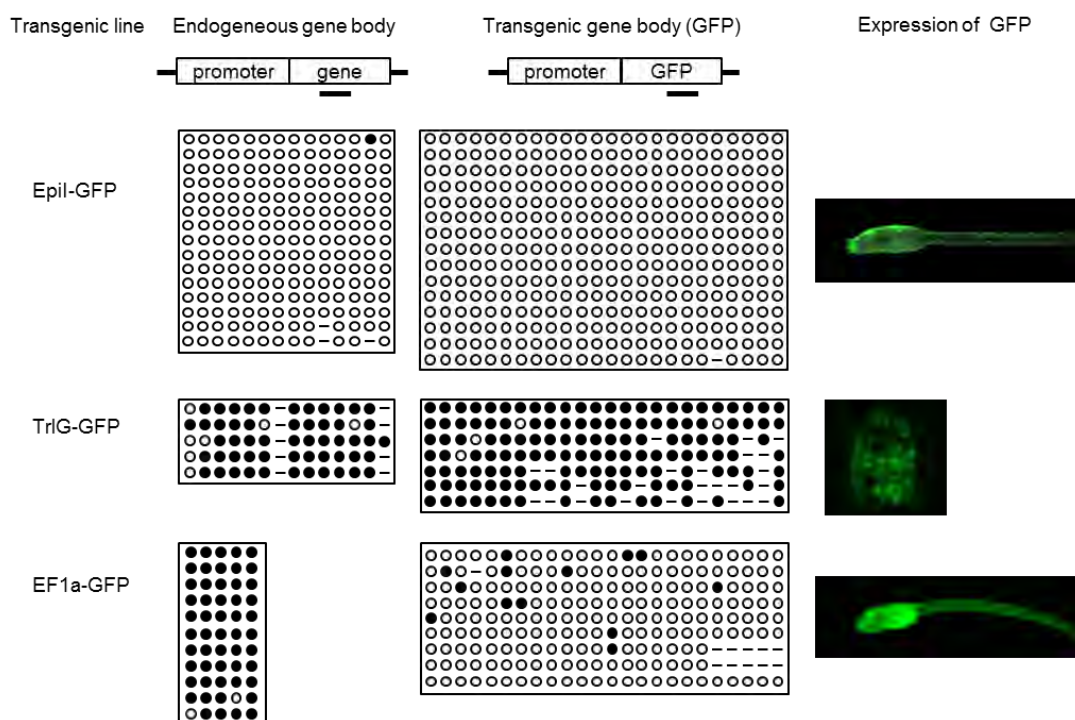


図3 トランスジェニックカタユウレイボヤにおける外来遺伝子の発現とDNAメチル化

### 3. 今後の展開

本研究により、無脊椎動物における gene body メチル化の特徴を明らかにすることができた。今後も引き続きヒストン修飾やメチル化結合タンパク質の分布を解析し、gene body メチル化の機能の解明を行う。また、gene body メチル化が遺伝子の発現 ON/OFF を制御しているのではなく転写反応を調整している可能性について、さきがけ期間中に着手した研究をさらに進めていきたい。

### 4. 自己評価

研究期間内には本研究のねらいである gene body メチル化の機能と分子機構の全解明には至らなかったが、ターゲット遺伝子の詳細な解析から gene body メチル化の機能が恒常的に発現している遺伝子にあることがわかった。また計画に基づいてさまざまな実験に挑戦し、機能解明の手がかりとなる予備データを得ることができた。今後この手がかりをもとに研究をさらに発展させたい。

### 5. 研究総括の見解

DNA メチル化は通常遺伝子の発現に抑制的に働くと考えられている。ところが DNA メチル化が集中している遺伝子転写領域 (gene body) ではどのような働きがあるのか理解されていない。ここでは gene body に DNA メチル化が局在している無脊椎動物 (カタユウレイボヤ) をモデルにメチル化模様の意義を探った。その結果、DNA メチル化は恒常的に発現する遺伝子でのみ見られること、プロモータ配列に依存すること、組織特異性はなく同じ遺伝子で観察されることなどを明らかにした。その意義は大きいが研究はまだ緒についたばかりである。

このテーマは DNA メチル化の本質に迫るという点で、チャレンジングなテーマである。重要なテーマであるので今後とも gene body メチル化の機能とその分子機構の解明に向け更なる発展を期待したい

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Sasakura Y., Suzuki M.M., Hozumi A., Inaba K. and Satoh N. Maternal factor-mediated epigenetic gene silencing in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Molecular Genetics and Genomics* 2010 283 pp. 99-110.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Suzuki M., Yoshinari A., Obara M., Shigenobu S., Nakayama A. カタユウレイボヤの gene body メチル化と遺伝子発現 日本遺伝学会第 83 回大会 京都 2011 年 9 月 20 日
2. Suzuki M. and Takahashi H. 尾索動物のエピジェネティクス: 遺伝子内部の DNA メチル化は種内変異の原因である 日本進化学会第 14 回大会 東京 2012 年 8 月 23 日
3. Suzuki M. Gene body メチル化の機能の解明 日本発生生物学会 夏季シンポジウム 2012 静岡 2012 年 9 月 4 日
4. Suzuki M. and Ueno N. Nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in mouse ES cells. 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡 2012 年 12 月 13 日