

次世代シーケンサーを用いた生殖系列のエピゲノム修飾 とトランスクリプトーム解析

Analysis of epigenome marks and transcriptome in the
germ line by the next generation sequencer

河野 友宏 (KONO TOMOHIRO)

東京農業大学・応用生物科学部・教授



研究の概要

哺乳類の生殖系列におけるエピゲノム情報のリプログラミング機構の全貌解明を目指し、次世代シーケンサーを用いて、マウスにおける始原生殖細胞から、精子・卵子ならびに胚の DNA メチル化解析を単一シトシン残基レベルで全ゲノムを対象に包括的に実施する。同時にトランスクリプトーム解析を実施し、DNA メチル化による遺伝子発現制御の包括的理解を深める。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・統合動物科学

キーワード：生殖系列、エピゲノム、トランスクリプトーム、DNA メチル化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖細胞における機能獲得機構の解明は、動物生産学、生殖医科学あるいは発生生物学の根幹をなす普遍的な重要研究課題に位置づけられる。雌雄生殖細胞である精子および卵子のゲノムが正常に機能して個体形成を達成するには、卵子および精子に特異的な DNA メチル化修飾をはじめとするエピゲノム情報の獲得が不可欠である。しかしながら、包括的かつ全 CpG サイトを対象とした解析はほぼ不可能であった。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類の生殖細胞ゲノム機能に必須のエピゲノム情報、特に DNA メチル化修飾の生殖系列（初期胚および胎仔を含む）における成立過程の全貌解明と転写制御の解明を目的に実施する。すなわち、雌雄生殖系列細胞ゲノム DNA の非メチル化シトシンをウラシルへ変換処置し、次世代シーケンサーを用いた大量シーケンスを行い、リード配列のマッピングおよび集計、解読情報のデータベース化を推進する。また、生殖系列細胞および胚で転写される全 mRNA のシーケンスにより遺伝子発現レベルを決定する。

3. 研究の方法

1) 始原生殖細胞、前精原細胞、非成長期卵母細胞、精子および卵子に由来する DNA の非メチル化シトシンのウラシルへの変換処置した後、次世代シーケンサーを用いて

DNA 断片の大量シーケンス解析を実施する。2) データ解析システムを用いたシーケンスデータのマウスゲノム配列へのマッピングおよびリード配列の集計を行い、染色体ごとのメチル化および非メチル化領域の頻度情報解析を実施する。3) さらに、1) の生殖系列細胞で転写されている全 mRNA のシーケンスにより遺伝子の発現レベルを直接コピー数として定量解析し、DNA メチル化による制御との関連を調べる。4) 専用解析ソフトによるそれらの情報のデータベースを構築して公開する。なお、DNA メチロームマップ作製には Genome Analyzer II と HiSeq2000 の 2 台の次世代シーケンサーを併用して実施する。

4. これまでの成果

全ゲノムを対象としたバイサルファイトシーケンス (Whole Genome Bisulfite Sequencing: WGBS) の DNA 調整法である MethylC-seq を改良し、約 50 ng の DNA から WGBS 用 DNA ライブラリー調整が可能な Whole Bisulfite Amplification sequencing (WBA-seq) を開発した。これらの手法を用いて、マウス精子・卵子の DNA メチロームマップ作製を実施した。これまでに約 1,700Gbp におよぶ膨大な DNA メチル化情報を取得した。

DNA メチル化酵素結合因子 Dnmt3L ノックアウトマウスの卵子の DNA メチロームマップおよびマウス胚盤胞、ES 細胞のメチロームマップも同様に作製することに初めて成功した。

作製された DNA メチロームマップの解析により、数多くの生殖細胞間メチル化差異領域 (Differentially Methylated Region: DMR) の同定と、Gene-body メチル化とゲノムワイドな転写との間の有意な相関を証明することができた。また卵子での DNA メチル化は一部の反復配列を除くほぼすべての DNA 配列において Dnmt3L 依存的であることが明らかとなった (PLoS Genetics, 2012)。また新規 DMR 群から、2009 年に当研究室で同定したマウス 1 番染色体上のインプリント遺伝子 Zdbf2 近傍にある母由来メチル化 DMR (Gpr1-DMR) を同定した。この DMR の解析から、Gpr1-DMR から転写される長鎖非コード型 RNA (long non-coding RNA: lncRNA) を同定し、父由来特定発現をするインプリント発現遺伝子を新たに同定した (FEBS Letters, 2012)。

PBAT (Post-Bisulfite Adaptor Tagging) 法により、1-10 ng の DNA からでも DNA 増幅ステップなしで WGBS 用 DNA ライブラリー調整が可能となり、生殖細胞 1000 個からのライブラリー作製に成功し、雄の始原生殖細胞 (精子・卵子の前駆細胞) の DNA メチローム解析を行った。Oct4-GFP マウス (生殖細胞特異的に GFP 発現) 生殖巣からの FACS ソーティングによって始原生殖細胞を回収した。生殖細胞の性決定前後の DNA メチロームマップを作製することに成功し、始原生殖細胞の包括的メチル化解析を行った。その結果、染色体特有のメチル化パターンの変化、特定のレトロウイルス由来 DNA の脱メチル化抵抗性、雄性始原生殖細胞における CpG、非 CpG メチル化の上昇および X 染色体連鎖遺伝子の新規メチル化抵抗性が明らかとなった。本研究結果は科学雑誌 Genome Research (2013) にて報告した。また、DNA メチル化酵素ファミリー: Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3L の欠損マウス卵子における DNA メチロームマップの作製および解析に成功した。さらに卵子に蓄積する非 CpG メチル化が Dnmt3a, Dnmt3L に依存することが明らかとなった。また、PBAT 法を応用した WGBS 調整法の開発により、少なくとも 1000 細胞からでも全ゲノム包括的な DNA メチロームマップの作製が可能となったことは特筆すべき点である。

5. 今後の計画

DNA メチル化の解析は予想以上の早さで成果を挙げることができたが、他にも主要なエピゲノム修飾であるヒストン修飾の解析が望ましい。ヒストン修飾抗体によるクロマチン免疫沈降 (ChIP) による解析には通常のプロトコルでは $1 \times 10^6 \sim 10^7$ 細胞以上が要求とされ、現状としては生殖細胞、特に卵子での解析の目途は立っていない。また近年、5 メチル化シトシン (5mC) が Tet タンパクの働きにより 5 ヒドロキシメチル化シトシン (5hmC) に変換されることが明らかにされて

いる。この現象は脱メチル化の誘導機構として注目を浴びている。また、現在、5hmC の検出方法としては、(1) 5hmC 抗体による免疫沈降 (2) グルコキシル化による 5hmC の感受的制限酵素処理、(3) Tet タンパクもしくは RuO₄ による酸化反応後のバイサルファイトショックエンスがあげられる。(1)、(2) は基本的に μg 規模の DNA を必要としており、(3) も多量の DNA を使用する上、変換率も高くない。いずれにしても現状としては、生殖細胞、卵子での解析の目途は立っていない。今後は ChIP-seq および 5hmC 検出用のプロトコルの改良に取り掛かり、卵子のエピゲノム修飾の包括的理解を目標に解析を進めたい。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
Mouse oocyte methylomes at base resolution 1 reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. Shirane K, Toh H, Kobayashi H, Miura F, Chiba H, Ito T, Kono T, and Sasaki H, **PLoS Genetics**, 2013 (in press) (IF:8.7).

High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T, Matsui Y, Kono T, **Genome Research**, 23 (4), pp616-627, 2013 (IF:13.6)

Imprinted DNA methylation reprogramming during early mouse embryogenesis at the Gpr1-Zdbf2 locus is linked to long cis-intergenic transcription. Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Kono T, **FEBS Letter**, 586(6), pp827-33, 2012 (IF:3.5)

Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T, **PLoS Genetics**, 8 (1), e1002440, 2012 # (IF:8.7)

ホームページ等
<http://nodai-konolab.net/>