

論文の内容の要旨

論文題目 ゲノムタイリングアレイを用いた網羅的メチル化解析法

氏名 林 浩志

細胞分裂後に娘細胞にその形質が受け継がれていくことは、生物にとって非常に重要である。この際 DNA の一次配列だけではなく、塩基配列の変化を伴わない形質も受け継がれていく。このようにゲノムに書かれた遺伝情報を変更することなく、個体発生や細胞分化の過程において、遺伝子発現を制御する現象をエピジェネティクスという。

そのなかでも、DNA のメチル化修飾（以降単にメチル化とする）は、同じゲノム配列を持ちながら異なる形質を持つ仕組みとして最もよく知られている現象である。真核生物においては、主にゲノム DNA のシトシン塩基の 5 位に起こる。脊椎動物では、シトシン塩基(C)の次にグアニン塩基(G)が続く CpG 配列中（p はリン酸化の意）のシトシン塩基がメチル化されており、全体の 60-90%の CpG がメチル化されていると言われている。通常、転写がオンになっている遺伝子のプロモーター領域はメチル化されていないが、メチル化 CpG がこの領域に蓄積すると、その遺伝子はサイレンシングされる。また、プロモーター領域の約半分は、特に CpG 密度が高くなっており、CpG アイランドと定義づけられている。こうしたプロモーター領域のメチル化制御は、ゲノムのインプリンティング、X 染色体の不活化、細胞分化に関わっている。

癌においては DNA のメチル化異常が起きており、ゲノム全体的には低メチル化状態になっている。これが染色体不安定性やマイクロサテライト不安定性を引き起こす。一方、様々な癌抑制遺伝子のプロモーター領域が、局所的に抗メチル化状態になっており、活性が不活化している。

癌化に重要なメチル化状態の変化がゲノムのどの部分に存在するかを調べることは非常に重要であり、近年、さまざまな網羅的解析法が開発されている。その多くが、メチル化感受性制限酵素を用いてメチル化の相違を見出す方法であり、癌特異的なメチル化領域が数多く報告されている。しかし、このようなメチル過感受性制限酵素を

用いる方法は、解析領域が酵素サイト近傍に限定されることや、酵素サイトの多型や変異などによりプロファイルが変化するという解決すべき問題がある。

発癌のように多段階を経て起こる複雑な疾患では、一度に多くのメチル化異常をゲノム全体に渡って調べることで、これまで理解されていなかった発癌メカニズムが明らかになることが期待される。そこで、本研究の目的は、抗メチルシトシン抗体を用いた免疫沈降法と、ゲノム配列を連続的に合成したオリゴヌクレオチドプローブを搭載したゲノムタイリングアレイを組み合わせた新規 DNA メチル化高解像度解析法の確立を行うことである。免疫沈降により、メチル化している DNA のみ効果的に濃縮することができ、その DNA をタイリングアレイにより染色体上にマッピングすることによって、CpG アイランドやプロモーターなどの領域に限定されない網羅的解析が可能であると考えられる。具体的には、ゲノムの 1%を詳細に解析することをめざした ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) 計画で定められた領域にプローブが設定されているタイリングアレイを用いて、ヒト大腸癌由来細胞株のメチル化プロファイルのマッピングを試みる。

まず、本解析法における重要なステップの一つである免疫沈降について検討を行った。2 種類の市販抗メチルシトシン抗体のうち、DNA をニトロセルロース膜に固定させ抗体で検出を行うイムノブロットィングの結果から、感度が優れている抗体を選択した。また、抗体の特異性を調べるために、脱メチル化剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine (5Aza-dC) で処理した細胞から抽出した DNA と未処理の DNA を用いてイムノブロットィングを行ったところ、未処理の DNA と比較して処理した DNA では、強いスポットが得られた。この結果から、メチル化した DNA に特異的な抗体であることが確認された。

次に、選択した抗体を用いて免疫沈降を行った。まず、免疫沈降の効率を上げるためにゲノム DNA を超音波で 200-700bp に断片化した。次にプロテイン A セファロースと共にプレインキュベートしておいた抗体溶液に断片化した DNA を加え、免疫沈降を行った。免疫沈降で得られた DNA を用いて、メチル化が確認されている領域に設定したプライマーで PCR を行ったところ、増幅が認められた。一方、メチル化していないハウスキーピング遺伝子のプロモーター領域は増幅が認められなかった。すなわち、免疫沈降によってメチル化した DNA が濃縮されていることが確認された。

免疫沈降で得られた DNA をマイクロアレイ上のオリゴ DNA プローブとハイブリダ

イゼーションさせるためには、ランダム増幅を行う必要がある。本法では、バイアスが少ないリニア増幅法である *in vitro* 転写により、増幅を行った。そして、末端標識法でビオチン標識した DNA をハイブリダイズさせ、蛍光標識が結合したストレプトアビジンと反応させた後、シグナル強度をマイクロアレイスキャナーで読みとった。

タイリングアレイ専用の解析ツールを用いて、550bp の Window 内に存在する免疫沈降 DNA と Input DNA (全ゲノムコントロール) のシグナル強度について Wilcoxon の順位和検定を行い、有意差を算出した。この 550bp の window をプローブ間隔でシフトさせていくことにより、プローブ数と同じ window が生成され、これらに対応した p-value が算出される。そして、 $P < 10^{-2}$ 以下の領域をメチル化候補サイト (Candidate Methylated Site; CMS) とした。

CMS の特徴について調べたところ、平均 CpG% は 6% を越え、ENCODE 領域中からランダムに選択した場合 (2.3%) に比べて約 3 倍になっていた。CpG アイランドに代表される CpG 密度が高い領域が優先的に選択されていると考えられた。そのため、癌で起こるような遺伝子のサイレンシングに関わる CpG 密度が高い領域のメチル化プロファイルの変化をモニタリングするのに適した方法であることが示唆された。また、CMS のゲノム上の位置を調べた結果、遺伝子調節に関わる遺伝子の 5kb 上流から翻訳開始点までの領域、エクソン領域、翻訳終了点から 5kb 下流までの領域の割合が増えていた。上流のプロモーター領域に関しては癌抑制遺伝子を中心によく研究されており、DNA のメチル化と遺伝子の不活性化のメカニズムが知られている。しかし、今回得られた結果では遺伝子の下流配列がメチル化している例がこれまで考えられている以上に多かった。遺伝子 3' 下流領域のメチル化に関しては、まだよくわかっていないが、ヒトの転写産物中には多くのセンス-アンチセンスペアが含まれていると報告されており、こうした標的遺伝子の逆方向からの転写産物であるアンチセンス RNA の転写に関係している可能性もある。

得られた CMS のメチル化状態を確認するために、Bisulfite 処理後の DNA の塩基配列決定を行った。Bisulfite 処理を行うとメチル化していないシトシンはチミンに置換されるが、メチル化シトシンは置換されない。この反応後にシーケンスを行うことによりメチル化状態を一塩基毎に調べることができる。これにより、全 40 領域のシーケンスを行った。その結果、25 箇所の CMS のうち 24 箇所 (96.0%) が、50% 以上のメチレーション率を示した。シーケンスの結果、本法では低 CpG 密度の領域のメチル

化も検出することが可能であった。また、*p*-value 毎にメチレーション率を調べたところ、 $P > 10^{-2}$ では平均 36.2%であったが、 $P < 10^{-2}$ では、66.1%であった。さらに $P < 10^{-3}$ では 85%を越え、それ以降はさほど変わらなかった。統計学的には、 $P < 10^{-2}$ で有意差が得られていたが、実験的には、 $P < 10^{-3}$ で高頻度にメチル化 DNA が検出されていると考えられた。

シーケンシングを行った 40 領域のうち、13 領域は 11 のホメオボックス遺伝子を含む、約 100kb の *HOXA* クラスター領域に位置する。これらの遺伝子は、正常な四肢の発生に必要であり、癌において *de novo* のメチル化が起こる領域として知られている。シーケンシングの結果、総じて CMS、または近傍にメチル化が認められた。そして、メチル化状態の変化に富んでいる領域であることが確認できた。さらに本法では、一つの遺伝子領域内のメチル化パターンを検出することも可能であった。これらのことから、高解像度の網羅的メチル化解析法として有用であることが示された。

また、ChIP (クロマチン免疫沈降) -chip 解析によるアセチル化ヒストンとの比較では、転写が活性化されていると考えられる非メチル化領域にアセチル化ヒストンが結合し、転写が抑制されているメチル化領域には結合しないという一般的な現象が認められ、当該メチル化解析法の妥当性が示された。

2005 年、ヒト全ゲノムを解析対象としたヒトエピゲノム計画が提唱され、いよいよ大規模な解析がスタートする。これまでの DNA メチル化に関する研究は、プロモーター領域や CpG アイランドに特化した解析が主であった。本論文では、ヒト 1%のゲノムの詳細な解析を行ってきたが、全ゲノムのタイリングアレイも既に使用可能な状態である。そのため、当該新規メチル化解析法は、こうしたゲノム全体の DNA のメチル化状態を高解像度でマッピングするツールとして非常に有用であると考えられた。このツールによって癌だけでなく、生命現象としての DNA メチル化修飾の謎が解明されることを望んでいる。