

審査の結果の要旨

氏名 生越 克己

本研究はゲノムワイドな DNA メチル化の変化を、低価格且つ簡便に検出するために、次世代シーケンサーとメチル化感受性制限酵素を併用する事を決定し、様々な条件検討の後、methylation-specific digital sequencing (MSDS 法)を開発するに至る経緯と、MSDS 法を使用して得た結果である。下記の結果を得ている。

1. 発生分化や癌化過程に深く関わり、細胞の形質変化を制御する因子の一つである DNA メチル化を、ゲノムワイドに測定する方法は多数開発されたが、現状では測定には膨大なデータ量と高額な費用が必要不可欠とされている。この負担を軽減するために、私はメチル化感受性制限酵素と次世代シーケンサーを併用する methylation-specific digital sequencing (MSDS 法) を開発した。
2. 今回 DNA メチル化の測定方法を作製する目的は、ゲノムワイドな DNA メチル化の変化をより簡便に測定することである。この為、CpG island や遺伝子のプロモーター領域、及びそれ以外の領域の DNA メチル化を測定出来る事が必須であり、更に、サンプル作製手技やデータの取り扱いが簡便である事が重要とされた。そこで、制限酵素認識サイトの数を抑えつつ、測定可能な CpG island の数を最大限に増加させる制限酵素の組み合わせを検討した。検討の結果、目的に最も則した組み合わせとして、メチル化感受性制限酵素の BssHII、EagI、SacII という 6 塩基認識酵素を 3 種類組み合わせで使用する事と決定した。
3. MSDS 法で使用した 3 種類のメチル化感受性制限酵素の切断効率が、実際に制限酵素認識サイトに存在する CpG ヌクレオチドの DNA メチル化と相関する事を確認した。確認用のサンプルとして、3 種類の制限酵素認識サイトを含み、全塩基配列の判明している λ DNA を用意した。 λ DNA は DNA メチル化が存在しないため、CpG ヌクレオチドが高メチル化となる完全メチル化 λ DNA を作製した。 λ DNA、完全メチル化 λ DNA、両者を 1:1 で混ぜた λ DNA の 3 種類のサンプルをメチル化感受性制

制限酵素で消化して、切断状況を電気泳動で確認した。その結果、制限酵素の切断効率と DNA メチル化割合に相関関係がある事を見出した。

4. MSDS 法における、3 種類のメチル化感受性制限酵素の使用する順番を決定する為、同じゲノム DNA に対して、制限酵素を使用する順番のみを変えたサンプルを作製した。制限酵素の使用順番が変わることにより、制限酵素の切断効率に変化し、シーケンス結果に偏りが生じる可能性を考慮して、シーケンス結果における制限酵素の偏りが最も少ない使用順番を選択した。その結果、SacII→EagI→BssHIII という使用順番を選択した。
5. MSDS 法では短い DNA 断片を得る際に超音波破碎装置を使用する為、 λ DNA を使用して超音波破碎の使用条件の検討を行った。超音波破碎時間と破碎条件を変えた際に出来る DNA 断片のサイズと回収量を、電気泳動と Agilent 2100 バイオアナライザーを使用して確認した。その結果、MSDS 法で使用する 120~160bp の DNA 断片は、超音波破碎装置の条件を、1 サイクルを on ; 5 秒、off ; 15 秒、超音波破碎時間を計 300 秒とした際に最も回収量が多いことが判明し、これを設定した。
6. メチル化感受性制限酵素は、認識配列にメチル化された CpG ヌクレオチドが存在すると消化されない。言い換えれば、メチル化されていない CpG ヌクレオチドのみが存在する制限酵素認識サイトを消化する為、その断端に存在する認識サイトの CpG ヌクレオチドは当然メチル化されていない。MSDS 法はメチル化感受性制限酵素により消化された制限酵素認識サイトとその周囲の塩基配列(tag)を次世代シーケンサーで大量にシーケンスする方法である為、シーケンスの出現頻度の高い認識サイトとは、メチル化感受性制限酵素を使用して消化出来た認識サイトの事であり、その認識サイトに存在する CpG ヌクレオチドのメチル化比率は当然低くなる。しかし、各 tag はその特異的な塩基配列により、出現頻度が上昇する場合や、低下する場合、時には出現自体しなくなる可能性がある。原因として塩基配列の特異性、実験手技、サンプルの突然変異等が考えられるが、事前に推測する事が可能な原因に対処する為、あらかじめ利用可能な tag を選別した。選別により tag は 458,802 ヶ所から、86,897 ヶ所に集約された。また、集約された tag 数を MSDS スコアと名付けた。
7. MSDS 法を使用して収集したシーケンス情報 (tag) を使用してゲノムワイドな DNA メチル化を測定する事が可能であることを確認する為に、ヒト大腸癌細胞株である HT29 と HCT116 の計 2 種類の細胞株に対して MSDS 法を施行した。HT29、HCT116 の 2 種類の細胞株から、それぞれ 2,397,132 個と 2,971,226 個のヒトゲノムに存在する塩基配列として認識され、使用した 3 種類のメチル化感受性制限酵素のいずれか

の認識サイトを含む tag 情報を回収した。これらの tag 情報の中から、HT29 から 1,493,950 個の、HCT116 から 1,886,310 個の tag 情報を、MSDS スコアとして使用した。

8. MSDS 法の有用性を確認する為、ヒトゲノムから制限酵素認識サイトを含む 100 余りの部位をランダムに選択し、その部位の DNA メチル化割合を DNA メチル化の絶対定量法である bisulfite-sequencing 法で測定した。その上で、bisulfite-sequencing 法で測定した制限酵素認識サイトの DNA メチル化と、MSDS 法を使用して得た MSDS スコアを比較した。この結果、MSDS スコアと bisulfite-sequencing 法で測定した DNA メチル化は、MSDS スコアが高値であると DNA 低メチル化であるという逆相関の関係にあることが示唆され、制限酵素認識サイトも MSDS スコアを基に 3 種類のグループに分けられた(DNA 高メチル化、DNA 中程度メチル化、DNA 低メチル化)。
9. 全制限酵素認識サイトに対して MSDS スコアを基にしたグループ分けを行うと、約 30%が DNA 低メチル化グループに、約 60%が DNA 高メチル化グループに属していることが判明し、DNA 高メチル化、低メチル化の両極端な DNA メチル化パターンを示す制限酵素認識サイトで約 90%を占めていた。遺伝子周囲の DNA メチル化割合は、プロモーター領域において DNA 低メチル化なサイトの割合が高く、逆に gene-body において DNA 高メチル化なサイトの割合が高いことが示された。そして、いずれの領域においても、CpG island 上のサイトはそれ以外のサイトと比較して DNA 低メチル化なサイトの割合が高いことが明らかとなった。
10. 遺伝子発現と DNA メチル化の関係を測定する為、遺伝子を、5'SOLiD 法で測定した遺伝子発現量を基に 3 種類のグループに分けた。3 種類のグループで遺伝子の周囲に存在する DNA メチル化を測定すると、発現量が高い遺伝子は TSS 周囲の DNA メチル化が低下している傾向が強く、逆に発現量の低い遺伝子は DNA メチル化が TSS からの距離に依存した変化を示さないという結論に至った。
11. 大腸癌由来の細胞株である HT29 と HCT116 細胞の DNA メチル化が、どのような部位で、どの程度異なるかを検討する為、MSDS スコアを基に HT29 と HCT116 の DNA メチル化を比較した。この 2 種類の細胞株間で DNA メチル化が異なった部位 (DMRs) は、全制限酵素認識サイトの 9%に当たる 7,903 サイト存在した。DMRs の存在部位に関しては、DMRs は CpG island shore (CpG island の周囲±2000bp の範囲) に有意に多く観察されたが、遺伝子の TSS 周囲にはあまり存在しないことが示された。遺伝子発現量との関係において、プロモーター領域の DMRs と遺伝子発現量との相関を認めた。以上の結果より、プロモーター領域の DMRs は数自体少ないが、その多くが“遺伝子発現を制御する働きを持つ DMRs”であることが示唆され

た。

12. 異なる細胞株として、正常ヒト乳腺上皮細胞 (Normal human mammary epithelial cells ; HMEC)を用いて、DNA メチル化の比較を行った。HMEC 細胞から、1,346,711 個のヒトゲノムに存在する塩基配列を回収した。このうちの 64.2%にあたる 864,430 個の tag を MSDS スコアとして利用した。このデータを用いて、HT29、HCT116 と HMEC 細胞の DMRs のなかから、POPDC3、UCHL1、CHCHD6、WT1 遺伝子の周囲に存在した 4 カ所を選択した。この 4 種類の DMRs が他の大腸癌細胞株や膵臓癌細胞株において示す DNA メチル化を、MSP 法を用いて検索した。その結果、癌細胞の DNA メチル化は、UCHL1 遺伝子のように癌細胞で均等に変化を起しやす部位と、POPDC3、CHCHD6、WT1 遺伝子のように個々の癌細胞で異なる表現系を示す部位の両方が存在する事が示唆された。
13. HT29、HCT116 と HMEC 細胞の DMRs の働きを測定する為、以下の 3 点の条件を満たす CAMK2N1、MSL2、TNFSF9、GFI1 遺伝子周囲の 4 種類の DMRs を選択した。
“①DMR が遺伝子の TSS から 1~5kbp の距離に存在する事”、“②DMR よりも TSS に近い領域に制限酵素認識サイトが存在する事。そして、その領域は HT29、HCT116、HMEC 全ての細胞において DNA 低メチル化である事”、“③この TSS に関係する遺伝子の発現量が、細胞ごとに大きく異なっている事”。この DMRs の DNA メチル化の有無が遺伝子発現に与える影響を測定する為、レポーターアッセイを行った。その結果、CAMK2N1 遺伝子の intron に存在した DMR は、周囲の塩基配列と共にエンハンサー活性を持つ事、その活性は DMR における DNA メチル化の割合によりコントロールされている事が示唆された。
14. MSDS 法と 4 塩基認識のメチル化感受性制限酵素である HpaII を使用した方法を比較した。HpaII は CCGG という 4 塩基を認識して、94.2%もの CpG island を検索する事が可能であるが、それと引き換えに、制限酵素認識サイトが 2,302,391 ヶ所存在するという制限酵素である。HpaII には同じ 4 塩基を認識するメチル化非感受性制限酵素の MspI が存在する為、比較対象として使用した。HpaII と MspI を使用した方法でそれぞれ 4,189,531 個、5,714,853 個のヒトゲノムにマップされた塩基配列を回収した。MSDS 法と同様に、HpaII、MspI を使用して得られたデータと bisulfite-sequencing 法で測定した制限酵素認識サイトの DNA メチル化を比較した。この結果、メチル化感受性制限酵素である HpaII を使用した場合は、シーケンスされた回数が多いほど DNA メチル化が低いという MSDS 法と同様の結果を得た。一方メチル化非感受性制限酵素である MspI を使用した場合は、シーケンス回数と DNA メチル化に関係がないことが示された。しかし、“シーケンスされなかった

部位” = “tag が 0 個の部位” がどのような DNA メチル化を示すのかを判断するには不十分な結果であった。これはシーケンスによって収集したデータの数が少なかった為、制限酵素サイトの全体をカバーできていない事が推測された。以上の結果より、MSDS 法では十分に DNA メチル化を測定することが可能なシーケンス数であるにも関わらず、HpaII を使用した場合は不十分な結果しか得ることが出来ないという事が明らかとなった。

以上、本論文では HT29 と HCT116 の 2 種類の大腸癌細胞株の DNA メチル化を、今回開発した MSDS 法を用いて解析した。他の細胞株を用いたデータや、4 塩基認識の制限酵素 (HpaII) を使用した方法との比較から MSDS 法の有用性を明らかにした。本研究により得られた結果から、MSDS 法は DNA メチル化の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。