

ゲノムワイドなメチローム解読

河邊 佳典

発生・分化に伴うDNAメチル化状態の解析、がんなどの疾患に対するエピジェネティック変化異常の寄与に関する研究、そしてES細胞やiPS細胞の品質評価・規格化技術開発——これらの現場で、近年エピジェネティックな修飾のゲノムワイドな解析が有用になってきた。エピジェネティックな修飾のうち最初に発見されたDNA塩基シトシンのメチル化は遺伝子発現を眠らせる“しるし”であり、胚発生や腫瘍形成に重要な役割をしていることが多くの研究からわかってきた。本稿では、ゲノムワイドなDNAのメチル化パターン（メチローム）解読における最近の動向と今後の展開を述べる。

多くの真核生物のDNAメチル化は、遺伝子上流のプロモーター領域に多く見られ、広域な反復配列であるジヌクレオチド（CpG）部位（いわゆるCpGアイランド）のシトシンに、メチル基転移酵素（Dnmt）の働きでメチル基が転移することで起こる¹⁾。メチル化DNAの解析は、(1) バイスルファイト処理による塩基変換、(2) HpaIIなどメチル化感受性制限酵素による切断、(3) 抗メチル化シトシン抗体やメチル化DNA結合タンパク質への結合、のいずれかに基づいて行われている。

そのうち最も一般的なのが(1) バイスルファイト塩基配列解読法で、原理は次のとおり。重亜硫酸ナトリウム（sodium bisulfite: NaHSO₃）でDNAを処理すると、メチル化されているC（mC）には影響がなく、メチル化されていないCのみが脱アミノ化によりウラシル（U）へと変換される。PCR反応時、mCはCとして、非メチル化Cはチミン（T）として増幅されるため、メチル化状態を察知できる。このPCR操作を、バイスルファイトPCRと呼ぶ。

近年、このバイスルファイトPCRでメチル化を検出したあと超並列塩基配列解読法（次世代シーケンサー）を用いてゲノム網羅的スクリーニングを行うことで、一塩基レベルの解像度で、ES細胞や胚性繊維芽細胞由来のマウス/ヒトゲノムの解読地図が作製できるようになってきた^{3,4)}。その結果、分化に伴ってメチル化されるCpGアイランドは少数で、生殖細胞特異的な遺伝子にそれらが多いことがわかった。また、ES細胞から神経分化させた培養細胞におけるCpG密度の高いプロモーター領域では、経代培養するにつれて、メチル化されることがわかった。これらの知見から、少数のマスター遺伝子のエピジェネティックな修飾が発生・分化に影響を与えていること、また培養で新たなエピジェネティッ

ク修飾が起こることが示唆された。

バイスルファイト塩基配列解読法は今やメチル化解析法のゴールドスタンダードとなっているが、すべての真核生物のゲノム領域に適応するには、コストと時間、手間がかかる。そのようななか、Dengら⁵⁾によってES・iPS細胞と繊維芽細胞由来のヒトゲノムDNAにおけるメチローム解析が行われた。ヒト繊維芽細胞と、そこから誘導したiPS細胞、ヒトES細胞、ES細胞と繊維芽細胞を融合した細胞を解析したところ、DNAメチル化と遺伝子発現の関係では、転写開始点上流および下流の2.4 kbで、遺伝子発現と最も強い負の相関関係が見られた。またゲノム全体を見ると、iPS細胞>ES細胞>繊維芽細胞の順で、メチル化状態の割合が高いことがわかった。

Dengらの研究では、バイスルファイト変換DNAに対して、メチル化部位の両端でハイブリダイズ可能な一本鎖プローブ（パドロックプローブ）による標的化が行われた。パドロックプローブは、プログラム化したマイクロアレイを基盤にして、発生・分化に関連するプロモーター領域などを含めた多くのCpG領域をカバーできるように設計されているため、CpGアイランドに対して高い特異性を示す。ハイブリダイズ後の反応の詳細は割愛するが、次世代シーケンサーでの解析により、メチル化DNAの塩基配列部位を一塩基レベルで同定できた。この方法はパドロックプローブの使用によりシーケンス解析領域をCpGアイランドに限定できるため、ゲノムワイドでのメチローム解析において、高解像度とコスト低減が実現できると期待されている。

今後、発生・分化やリプログラミングといった生命現象におけるエピジェネティクスの役割が解明されるほど、また、医療への応用面が増すほど、ゲノムワイドにメチル化DNAを解析したいというニーズが増すものと予想される。ここで紹介した技術を含めてメチローム解析の基盤をさらに創成することで、ゲノムDNA中に存在する全CpGの配列に対して高解像度、定量的、かつ正確に解析できる日はそう遠くないかもしれない。

- 1) Holliday, R. and Pugh, J. E.: *Science*, **187**, 226 (1975).
- 2) Okano, M. *et al.*: *Nat. Genet.*, **19**, 219 (1998).
- 3) Meissner, A. *et al.*: *Nature*, **454**, 766 (2008).
- 4) Lister, R. *et al.*: *Nature*, **462**, 315 (2009).
- 5) Deng, J. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **27**, 353 (2009).