

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒトES細胞の性質に関わる新規エピジェネティックコードの探索

氏名 石川 靖久

### <背景・目的>

DNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな制御因子は遺伝子発現変化をもたらす、細胞分化の過程に大きな影響を与え、また生物の一生においてその存在部位・量は大きく変化する。これらのエピジェネティックファクターはメモリーとしての役割を持ち、分化後もその情報は引き継がれ保存される。そして細胞リプログラミングにおいてこのエピジェネティックメモリーにはリセットによる大幅な変化が生じ、それは細胞が分化万能性や自己複製能などの特性を獲得する上で不可欠なものと考えられている。エピジェネティックファクターの中でも、DNAメチル化シトシン (5-methylcytosine : 5mC) の酸化生成物である DNA ヒドロキシメチル化シトシン (5-hydroxymethylcytosine : 5hmC) は、DNA 脱メチル化機構の中間産物であり、さらなる酸化を受けて最終的にはチミン DNA グリコシラーゼという酵素により DNA 上から取り除かれる。また、この 5hmC は神経細胞や ES 細胞 (Embryonic Stem Cell : ESC) に多く存在することから、ESC の特性獲得に深く関わっていることが示唆されている [1, 2]。

近年、DNA においてアミノ酸情報を示す遺伝コードに準えて、「エピジェネティックコード」という概念が提唱されている。これは DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな因子が組み合わさることにより一種のコードを形成し、個々の細胞がもつ特性を作り出すというものである。一例として ESC において見られる bivalent domain があり、これは development 関連遺伝子群のプロモーター領域において、転写活性化エピジェネティックファクターである H3K4me3 と抑制ファクターの H3K27me3 が共存することによりこれら遺伝子群を poised な状態に保ち、ESC の特性である多能性を維持することに寄与している [3, 4]。さらに DNA メチル化とヒストン修飾間の関係については、Poly-comb Repressive Complex 2 (PRC2) 複合体が bivalent promoter 領域へ 5mC 酸化酵素である TET タンパクを呼び寄せ、ESC の bivalent プロモーター領域を低メチル化状態に保つという機構が実験の下に報告されている [5, 6]。しかし、未だ完全なエピジェネティックファクター間相互作用の解明には程遠いのが現状である。

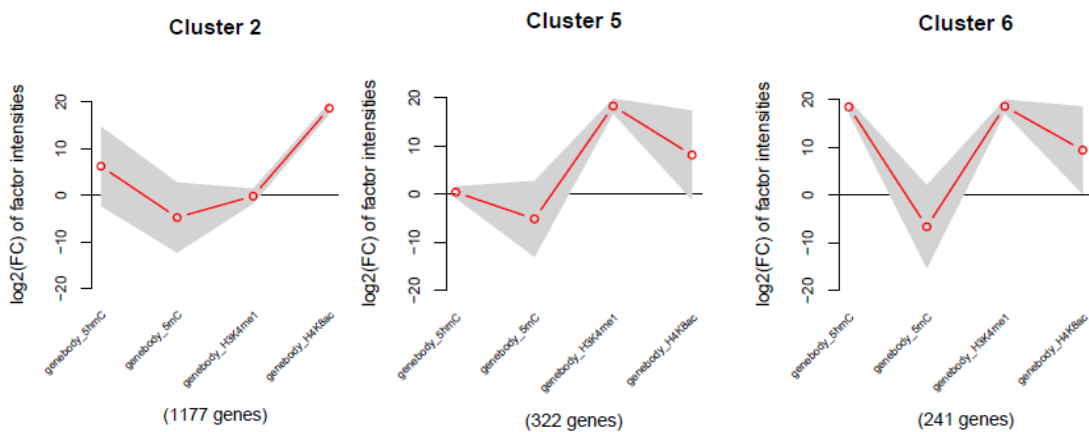
そこでこれらの事実に鑑みて、今回は特に ESC における各エピジェネティックファクターに関する公共 NGS データを用いた解析を行い、ESC の性質に影響を及ぼす可能性を持った新たなエピジェネティックコードの探索を行った。

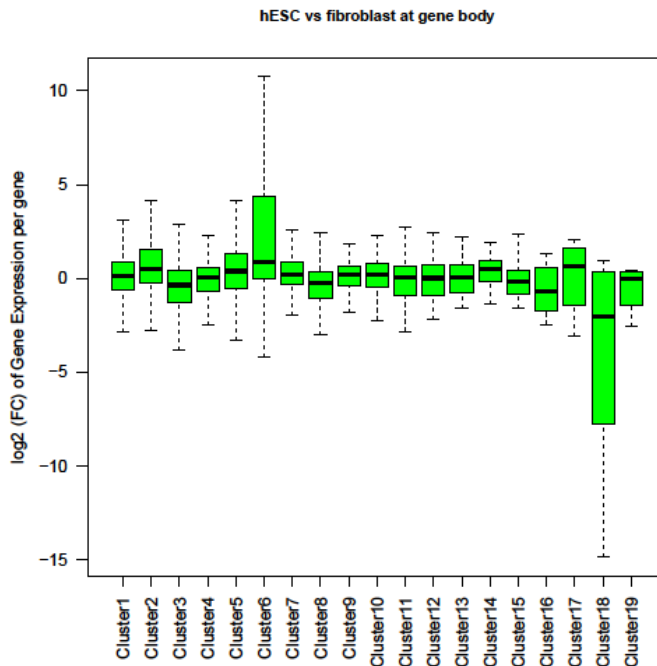
<方法>

Gene Expression Omnibus (GEO) 及び DNA Data Bank of Japan (DDBJ) から、5mC、5hmC、各種ヒストン修飾、及び遺伝子発現に関する公共データをダウンロードした。5mC、5hmC、ヒストン修飾については主に MeDIP-seq、hMeDIP-seq、及び ChIP-seq などの免疫沈降法や、これに準じた方法を用いたデータを使用し、遺伝子発現に関しては RNA-seq データを利用した。また各遺伝子領域近辺に含まれるマップドリード数を正規化したものを、各々の遺伝子がもつ各エピジェネティックファクター強度として定義した。

<結果>

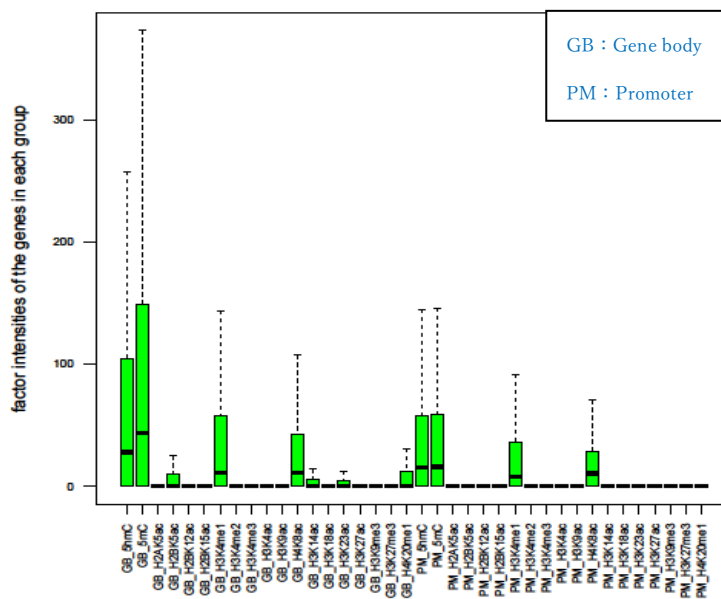
1. 各遺伝子に含まれる、合計 19 個のエピジェネティックファクター (5mC、5hmC、及び 17 個のヒストン修飾) 強度を使用し、全遺伝子を用いたファクター間のピアソン相関係数 (Pearson's Correlation Coefficient : PCC) を求めた。その結果、5hmC、H3K4me1、及び H4K8ac 間での高い相関 (PCC : 5hmC vs H3K4me1 = 0.86、5hmC vs H4K8ac = 0.73) が確認された。
2. 上記の 5hmC、H3K4me1、及び H4K8ac に 5mC を含めたファクターの組み合わせが、遺伝子発現に与える影響を調べるために階層的クラスタリングを行った。hESC と体細胞 (Fibroblast) 間の各ファクター強度変化を組み合わせるパターン化し、全遺伝子を 19 個のグループに分類した。その結果 hESC において 5hmC、H3K4me1、及び H4K8ac の enrichment が見られる Cluster 6 が他のグループと較べて遺伝子群の顕著な発現増加傾向を示した。しかし H3K4me1 に変化が無い Cluster 2 や、5hmC に変化が見られない Cluster 5 においては明確な発現変動傾向が見られなかった。





3. 非負値行列因子分解 (Non-negative Matrix Factorization : NMF) アルゴリズムを活用した解析を行い、潜在的に存在するエピジェネティックファクター共起を探索して、その生物学的特徴を調べた。全遺伝子と 19 個のエピジェネティックファクターをそれぞれ 8 個のグループに分類した結果、その内の 1 つの遺伝子グループでは gene body と promoter 領域において、5hmC、H3K4me1、及び H4K8ac の enrich 傾向が見られた。

グループ 8 における各エピジェネティックファクター強度



また、この遺伝子グループの Gene Ontology の結果は免疫との関連性を示した。

#### <考察>

エピジェネティックコードの必要条件として、今回の研究では下記の 3 つの条件を満たすものと考えた。

- (a) 遺伝子領域において共起が見られるエピジェネティックファクター群であること。
- (b) この共起が ESC 特異的な遺伝子発現に影響を及ぼすこと。
- (c) これらの結果として ESC 特有の性質をもたらすこと。

エピジェネティックファクター 5hmC、H3K4me1、及び H4K8ac 強度間に高い相関が見られたことは、遺伝子単位で見たときにこれらのファクターの分布に類似性が見られ、お互いが共起していることを示している。ヒト ESC において同じ領域に 5hmC と H3K4me1 が共起する傾向があることが先行研究において報告されているが[7]、5hmC と H4K8ac についても共起が見られることは今回の研究により新たに発見されたものである。

また階層的クラスタリングの結果は、発現変動を引き起こすには 3 個のファクター (5hmC、H3K4me1、及び H4K8ac) が単独で存在するのではなく、共起していることが重要であることを示唆している。そして NMF 解析をもとにした Gene ontology 解析の結果から、この共起を示す遺伝子群には主に免疫との関連性があることが分かった。ESC や iPSC などの多能性幹細胞においても免疫による拒絶反応が存在することが知られており、今回の研究結果は新規エピジェネティックコード候補が、多能性幹細胞の性質と関連している可能性を示すものである。

#### <参考文献>

1. Pastor, W.A., et al., *Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 394-397.
2. Szulwach, K.E., et al., *Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells*. PLoS Genet, 2011. **7**(6): p. e1002154.
3. Bernstein, B.E., et al., *A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-326.
4. Vastenhouw, N.L. and A.F. Schier, *Bivalent histone modifications in early embryogenesis*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(3): p. 374-86.
5. Wu, H., et al., *Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 389-93.
6. Neri, F., et al., *Genome-wide analysis identifies a functional association of Tet1 and Polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells*. Genome Biol, 2013. **14**(8): p. R91.
7. Stroud, H., et al., *5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells*. Genome Biology, 2011. **12**(6): p. R54.