

カタユレイボヤのメチローム解析から探る組織特異的メチル化の起源

横山貴央 (47-106907)

指導教員：伊藤隆司

【背景・目的】DNA におけるシトシン 5 位のメチル化（以下 DNA メチル化）は、哺乳類における X 染色体の不活化や、ヘテロクロマチン領域の形成、組織特異的メチル化領域（tissue-specific differentially methylated region: tDMR）の転写制御への関与など、主に転写抑制に関わる現象として認識されてきた。

しかしながら、近年、様々な生物のメチル化がゲノムワイドに調べられるようになり、DNA メチル化が多く生物で保存された機構である一方で、生物種ごとに異なる役割を持つことが明らかになってきた。例えば、アカパンカビ（菌類）はトランスポゾンを選択的にメチル化するのに対して、ミツバチ（無脊椎動物）は遺伝子本体（Gene Body）を選択的にメチル化する。一方、シロイヌナズナ（植物）やヒト（脊椎動物）はトランスポゾンと Gene Body の双方をメチル化する。興味深いことに、Gene body のメチル化は、しばしば遺伝子発現と正の相関を示す。これらの研究の結果、トランスポゾンと Gene Body のメチル化が始原的なパターンであり、組織特異的なプロモータのメチル化は脊椎動物に特異的と考えられるようになった。

この説を検証するには、脊椎動物に最も近縁である尾索類における組織特異的メチル化の有無を明確にする必要がある。従来、尾索類の代表的モデル生物であるカタユレイボヤ（*Ciona intestinalis*）では組織特異的メチル化はないと考えられてきたが、その根拠は少数の遺伝子に関する解析結果であり、十分なものとは言い難い。最近、*C. intestinalis* の全ゲノムバイサルファイトシーケンシング（WGBS）解析も報告されたが、単一組織しか解析されておらず、組織特異的メチル化の有無については情報が得られなかった。

そこで本研究では、*C. intestinalis* の複数の組織について WGBS による高解像度メチローム解析を行い、それらの比較から組織特異的メチル化の有無を明らかにし、脊椎動物によく見られる tDMR による転写制御の起源を探ることを目的とした。

【方法】採取が容易でかつ細胞組成が比較的均一と考えられる Sperm（精子）、Body wall（体壁筋）、Heart（心筋）、Gill（鰓）の 4 つの組織を選び解析の対象とした。これらの 4 つのサンプルの中から、回収 DNA 量が比較的多かった Sperm と Body wall の 2 組織を先行的に解析に供した。WGBS 解析のための鋳型調製には Post-bisulfite Adaptor Tagging (PBAT)法を利用した。得られた鋳型 DNA からイルミナ社の Genome Analyzer IIx を用いて、121 塩基のシングルエンドモードにより各サンプル 2 レーンずつの配列決定を行った。得られたリードのマッピングおよびマッピング結果の可視化には所属研究室で開発されたマッピングツールとゲノムブラウザを用いた。組織間でメチル化率の異なる CpG 配列中のシトシン(Differentially methylated CpG: DmCpG)を Fisher の正確確率検定を利用して同定し、DmCpG の多い領域を tDMR としてゲノム中から探索を試みた。

【結果】Sperm と Body wall の双方で、90%のゲノム領域を 5 リード以上の厚みでカバーする高品質なメチロームデータを得ることができた。いずれの組織でも高度にメチル化されたシトシン（50%以上のメチル化率を示すもの）が全シトシンのおよそ 4%の割合で存在することが明らかになった。また、CpG、CHG、CHH の配列コンテキスト別にメチル化率の分布を比較すると、従来から知られていたように *C. intestinalis* では、CpG 配列のみがメチル化されることが明らかになった。

C. intestinalis では、CpG 局所密度を表す CpG スコアと DNA のメチル化率が逆相関する傾向が知られ、ゲノム配列情報のみから DNA がメチル化されているゲノム領域を予測することが

可能であるとされてきた。WGBS で実測されたメチル化率を CpG スコアと比較した結果、CpG スコアとメチル化率の関係はゲノム全体でも概ね成り立つことが分かった。その一方で、この法則に当てはまらない領域も多数同定された（予測メチル化領域の約 7%、予測非メチル化領域の約 10%）。

Sperm と Body wall のメチロームデータを比較した結果、それぞれの組織で異なるメチル化状態を示すシトシンが多数同定された。また、Sperm では Body wall に比べてより高いメチル化を示すシトシン残基が多い傾向があった。解析対象となった全 CpG 配列（2,067,759 残基）のうち 7.3%（151,526 残基）が、Fisher の正確確率検定によって、2 組織間で有意（ $p < 0.05$ ）なメチル化率の差異を示す CpG（DmCpG）と判定された。DmCpG の密度が高い領域の同定を試みた結果、従来の通説とは対照的に、*C. intestinalis* のゲノム上には多数の tDMR が存在することが明らかになった（図 1）。これらの tDMR の中には Sperm では発現せず、細胞分化後に発現が上昇すると期待されるミオシン遺伝子の成体型サブタイプで確認された Gene Body のメチル化（図 2）や、Sperm 特異的にプロモータ領域がメチル化されている例が含まれていた。

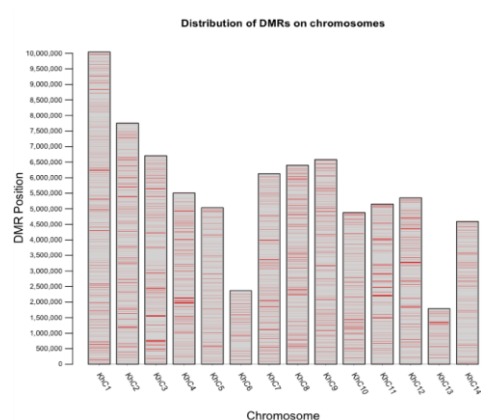


図 1 ゲノム中の tDMR の分布

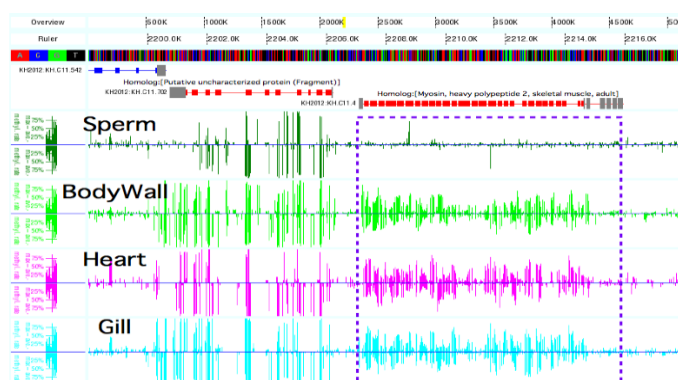


図 2 tDMR の例（ミオシン遺伝子成体型サブタイプ Gene Body）

【今後の課題】今回、*C. intestinalis* の 2 種類の組織でメチロームを比較した結果、これまで脊椎動物でのみ知られていた tDMR が多数同定された。同定された tDMR の中には、比較した組織間で異なる発現量を示すと考えられる遺伝子の Gene Body に相当する例や、組織特異的にプロモータがメチル化されている例が含まれていた。前者は、Gene Body のメチル化が転写量に対して正の相関を示すという性質を有することと考え合わせると、この領域の転写量が変化したことによって生じた tDMR である可能性もある。一方、後者に関しては、無脊椎動物では存在が確認されていなかったプロモータ領域のメチル化による発現制御を捉えた可能性もある。であるとすれば、動物界においては脊椎動物と尾索類の分岐以前にプロモータメチル化による発現が出現していた可能性を示すものであり、非常に興味深い。この可能性を検証するためには、組織別に RNA-Seq や TSS-Seq を実施し、それぞれの組織における RNA の発現量や転写開始点を決定する必要がある。また、DNA メチル化はヒストン修飾と強い相関があることも知られている。今後は、こうした様々なオーミクス情報との統合を図る必要があると考えている。

【参考文献】

1. Suzuki, M.M., Kerr, A.R.W., De Sousa, D. & Bird, A. CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Research* 17, 625–631 (2007).
2. Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P. & Zilberman, D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 328, 916–919 (2010).