

論文の内容の要旨

論文題目

ハイドロキシメチルシトシン(hmC)を同一分子上の塩基単位で同定する Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay (EnIGMA)法の開発とビタミン C 欠乏マウスの解析

黒田 友紀子

DNA メチル化は遺伝子発現制御などにかかわる可逆的な DNA 修飾である。メチルシトシン(mC)は Tet によりハイドロキシメチルシトシン (hmC) へ変化し最終的に base excision repair (BER)により非修飾 C に脱メチル化される。hmC は全シトシン中の 1%以下と少ないが小脳には比較的豊富に分布している。様々な神経疾患で分布の変化が指摘されているが生物学的な機能や役割は明らかではない。hmC はメチル化解析で標準的に用いられる bisulfite 反応では mC と同様の反応をするため鑑別は不可能である。bisulfite 反応では mC, hmC は C のまま、非修飾 C は T に変換される。これまでに hmC を塩基単位で検出する方法として TAB-seq や oxidative BS-seq が報告されてきた。いずれも bisulfite 反応の前に別の反応を加えることにより mC, hmC の区別ができるようにした上で通常の bisulfite 反応と比較することにより hmC を検出する方法であり正確な定量は困難であった。今回、mC, hmC を同一分子上の塩基単位で同時検出することができる手法、Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay (EnIGMA)を開発した。この手法は linker により逆鎖をつないだヘアピン型 DNA に対して、ヘミメチル CpG の逆鎖のみをメチル化する DNMT 1 の反応特異性を利用して mC と hmC を検出する方法である。この手法の手順は以下の通りである。ゲノムを適切な制限酵素で切断後、end-repair により切断断端を平端化し dA-tailing をおこなう。その後ウラシルを含むヘアピン型 linker をライゲーションする。USER enzyme (Uracil DNA glycosylase and Endonuclease VIII)反応により linker 内のウラシルを切断し、DNA ポリメラーゼにより linker 部分をプライマーとして逆鎖を合成して非修飾塩基からなる逆鎖をもつヘアピン型 DNA を合成する。この

ヘアピン型 DNA に対して DNMT1 反応をおこなうと、ヘミ mCpG をメチル化する性質をもつ酵素反応により mC の CpG の逆鎖はメチル化されるが、hmC, 非修飾 C の逆鎖はメチル化されない。その後の bisulfite 反応により mC の反対側のメチル化された逆鎖は C のままであり、hmC, C の反対側のメチル化されなかった逆鎖は T に変換される。PCR 後にシーケンスにされたデータからヘアピン内で元の鎖と逆鎖で対応するそれぞれの塩基を比較することによりその分子の mC, hmC, C を同時に判定することができる。しかしながら EnIGMA で mC, hmC, C の定量は DNMT1 反応性に依存するため、DNMT1 反応効率が低い状況では、メチル化されなかった塩基は hmC と判定されることになり、mC を歌過小評価、hmC を過大評価する。また DNMT1 は弱いながらヘミ mCpG 以外を de novo にメチル化する性質をもっており DNMT1 活性が高くなるにつれて de novo 活性は上がる傾向にある。その結果 DNMT1 活性が高い条件下では逆に hmC の逆鎖をメチル化すると mC と判定され、C の逆鎖をメチル化すると判定不能になり精度が低下する。従って DNMT1 のヘミ mCpG に対する特異的なメチル化活性は十分高いが、de novo のメチル化活性は低く抑えられる反応条件を維持することがこの手法の最も重要なポイントとなる。そこで DNA 量や pH、塩濃度などの反応条件を様々な修飾状態の CpG を含む合成 DNA で検討した。精度のコントロールのため反応の確認に mC, hmC, C を含む合成ヘアピン DNA を DNMT1 反応液中加入して spike-in-control とした。検討後至適な条件でおこなった合成 DNA の EnIGMA では mC, hmC, C ともに 93%以上の精度で検出することができた。マウス大脳ゲノムを用いて hmC が豊富に存在する領域 (*Arhgap27*, *Nhlrc1*) を実際に EnIGMA により解析した。EnIGMA により一分子ごとに mC, hmC, C の分布を評価し、次世代シーケンサーを組み合わせることにより数千分子から数%しか存在しない hmC を定量することができた。glucMS-qPCR (Glucosylation of genomic DNA followed by methylation-sensitive qPCR) でも同様の結果を得たことから、EnIGMA による解析結果は glucMS-qPCR による解析と一貫性があることが示された。ゲノムの解析において spike-in として用いた合成 DNA による反応確認より mC の 5%が hmC と判定されていることから解析ノイズは 5%程度であると推定された。

さらに生体内で DNA メチル化が変動する要因やそれに伴う影響を EnIGMA により解析することとした。酸化酵素 TET は iron and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase であり、還元鉄を維持するためビタミン C (VC) を必要とする。多くの哺乳類は肝臓でグルコ

ースから VC を合成しているが、ヒトでは合成段階の最終酵素である L-gulonolactone oxidase (Gulo)の変異により機能喪失していることから食物から摂取する必要がある。VC は抗酸化作用をもっており、VC 欠乏状態では他の代償機構が働くが、iron and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase は他で代用できず VC 欠乏は TET 反応に影響を及ぼす。培養細胞では、VC を加えることにより TET を介してプロモーター領域で mC の減少と hmC 増加がおきることが複数報告されている。個体レベルでは *Gulo* ノックアウトマウスに VC 投与を行うことで小脳、肺、肝臓で hmC 全体量が増加することが報告されているのみであり検討は不十分であった。生体内で VC 欠乏状態がどの程度メチル化に影響を与えるのか検討する必要がある。今回は生体内でも精子のメチル化に注目した。ヒト精子には hmC は $0.797/10^4$ 塩基とごくわずかに存在しているが、機能との関連は不明である。男性不妊と精子のメチル化異常との関連は複数報告されており、不妊男性に VC 補充を行なうことで精子の数や形態が改善したという報告がある。このような背景から VC 欠乏マウスにおいて精子のメチル化解析を行うこととした。VC 合成酵素である *SMP30* ノックアウトマウスを用いてマウス精子形成周期が 35 日であることから 1 回目は欠乏期間を 8 週間、2 回目は生存限界までの 16 週間を欠乏期間とした。抗 hmC 抗体を用いた dot blot では 1 回目、2 回目ともに VC 欠乏マウス精子で hmC 総量はおよそ半分まで減少が認められた。DhMR (differentially hydroxymethylated region)を同定するため、1 回目の欠乏実験マウスで抗 hmC 抗体を用いた hMeDIP-seq により精子で hmC が豊富な領域（ピーク）を ChIP 解析ツールの MACS2 で検出した。検出したピークを glucMS-qPCR により検証したが hmC は検出限界以下と偽陽性であり hmC の局在領域を検出することはできなかった。偽陽性を少なくするため、抗 hmC 抗体とは異なる濃縮方法である glycosylation による DNA enrichment を用いた野生型マウス精子の hMeDIP-seq データと照合し、共通するピークの 2 領域 (*Ptpn14*, *Smtnl2*)を同定して EnIGMA, glucMS-qPCR で確認した。2 領域それぞれ hmC が 10-20%, 5-10%と他領域よりも豊富に存在しており、精子中の hmC の局在領域を同定することができた。しかし、VC 欠乏とコントロールを EnIGMA, glucMS-qPCR により比較したところ *Ptpn14*, *Smtnl2* ともに mC, hmC に有意差は認めなかった。次に欠乏群とコントロール群の hMeDIP-seq データから DhMR を 4 領域 (*Zp1*, *Slit2*, *Zfp663*, *Ube2e2*)を検出し EnIGMA により確認したが hmC に有意差は認めなかった。メチル化解析から VC 欠乏により精子の hmC が減少することが明らかになった。VC

欠乏が TET 活性を低下させることを介して hmC の減少を起こしたと考えられた。欠乏が 8 週間、16 週間でも同程度の hmC の減少が認められた。精子形成周期が 35 日であることと合わせると精原細胞から精子の形成途中での VC 欠乏が精子のメチル化に影響を及ぼすこと、生存限界まで欠乏しても hmC は半分程度に保たれることが明らかになった。精子 hmC の減少は明らかになったものの本解析で DhMR を同定するに至らなかったが、マウス精子の解析を通してメチル化解析における EnIGMA の有用性を確認することができた。精子のように他の器官と比較して hmC が少ない細胞では、既存の hMeDIP では偽陽性が多く解析は困難であった。今回の EnIGMA は single locus 解析であったが、今後ヘアピン型 DNA のライブラリにメチル化アダプターを付加することでゲノムワイド解析への応用が可能である。ゲノムワイド解析により VC 欠乏マウス精子で DhMR を特定できる可能性がある。