

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 23 年度採択研究代表者

H25 年度
実績報告

白髭 克彦

東京大学分子細胞生物学研究所
教授

エピゲノム解析の国際標準化に向けた新技術の創出

§1. 研究実施体制

(1)「新規エピゲノム技術開発」グループ

- ① 研究代表者: 白髭 克彦 (国立大学法人東京大学分子細胞生物学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 微量組織からの ChIP-seq 解析法の構築
 - ・ オリゴクローナル抗体の性能評価
 - ・ 新規エピゲノム修飾の同定

(2)「細胞」グループ

- ① 主たる共同研究者: 和田洋一郎 (国立大学法人東京大学アイソトープ総合センター(先端科学技術研究センター兼任)、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 標準エピゲノム解析
 - ・ 病態エピゲノム解析
 - ・ 新規エピゲノム解析手法の開発

(3)「抗体開発」グループ

- ① 主たる共同研究者: 木村 宏 (国立大学法人大阪大学生命機能研究科、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ オリゴクローナル抗体の開発

(4)「情報解析」グループ(研究機関別)

① 主たる共同研究者: 光山統泰 (独立行政法人産業技術総合研究所生命情報工学研究センター、研究チーム長)

② 研究項目

- エピゲノム情報解析パイプラインの構築
- エピゲノムデータベースの構築
- エピパターン類似性検査ツール

§2. 研究実施の概要

本研究では、IHEC による標準エピゲノム解析のための標準化抗体の作製を目指して修飾ヒストン特異的オリゴクローナル抗体の開発を行っている。オリゴクローナル抗体とは、同一の標的を認識する異なるモノクローナル抗体を混合したものであり、モノクローナル抗体の特異性を保持しつつポリクローナル抗体以上の感度を有すると考えられる。IHEC では、種々のヒト正常細胞における転写の活性化や不活性化の指標となる 6 つのヒストン修飾についてエピゲノム情報を得ることを目標としている。昨年度までの研究で、H3K9me3とH3K27me3に対して複数の抗体の評価を行い、オリゴクローナル化に成功した。本年度は、これらの抗体を用いた微量 ChIP-seq 系の開発と H3K4me1、H3K4me3、H3K27ac に対する抗体の開発を行った。修飾ペプチドを用いた ELSA により、特異性の高い新規の抗体をスクリーニングした。さらに、修飾ペプチドアレイを用いて、その特異性と近傍の修飾による結合能への影響を解析した。その結果、H3K4me1 に対する抗体 3 種類は、それぞれ近傍の修飾による影響が異なっており、これらを混合することで H3K4me1 を持つクロマチンを近傍の修飾によらず回収できると考えられた。H3K27ac に対しては、どの抗体も S28 のリン酸化により結合性が阻害された。S28 のリン酸化は細胞周期の分裂期に起こるため、特に問題とならない可能性が高いが、今後 H3K27ac と S28ph を同時に持つペプチドを認識する抗体を作成していく必要がある。これまで得られている抗体を国内の CREST-IHEC チームや海外の IHEC チームに送付し、高い評価を受けたほか、IHEC で解析するヒストン修飾と ChIP に使用する抗体に関する注意点をまとめた総説を発表した (Kimura, *J. Hum. Genet.* 58, 439-445, 2013)。

エピゲノム解析については、内皮細胞を中心として 9 種類、28 内皮細胞からエピゲノム情報を取得した。内訳は、HAoEC (Aorta, 大動脈内皮細胞) を 6 例、HPAEC (Pulmonary artery, 肺動脈内皮細胞) を 4 例、HCAEC (Coronary artery, 冠動脈内皮細胞) を 5 例、HBCAEC (Brachiocephalic artery, 腕頭動脈内皮細胞) を 2 例、HUVEC (Umbilical vein, 臍帯静脈内皮細胞) を 4 例、HUAEC (Umbilical artery, 臍帯動脈内皮細胞) を 2 例、HENDC (Endocardial cells, 心内膜) を 3 例、HMVEC-C (microvasculature EC-Cardiac, 心臓微小循環内皮細胞) と CCA (Common carotid artery, 総頸動脈) が各 1 例であった。RNA-seq に基づく内皮細胞の分類を行ったところ、細胞毎に同じクラスターに位置すること、弾性動脈、筋性動脈、微小循環、静脈が異なるクラスターを形成する傾向が示された。6 例のドナーから複数種類の内皮細胞を調製することができたため、同一ドナーに由来し、異なる部位から採取された内皮細胞間でヒストン情報を比較したところ、プロモーターマークに比して、エンハンサーマークのばらつきが大きい傾向が示された。QC 結果において問題のなかった 191 実験、191 配列については、DDBJ に登録した。エピゲノム配列データ QC 用パイプラインを構築した。今後例数を増やすとともに、他のエピゲノム情報と統合的な解析を進めることにより、細胞毎に活性化している転写制御領域の全ゲノムマップが構築できると考えられる。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

1 Nakato R, Itoh T, Shirahige K, “DROMPA: easy-to-handle peak calling and visualization software for the computational analysis and validation of ChIP-seq data.” *Genes Cells*;18(7):589-601., 2013 (DOI: 10.1111/gtc.12058)

2 Saito Y, Tsuji J, Mituyama T, “Bisulfighter: accurate detection of methylated cytosines and differentially methylated regions” *Nucleic Acids Res.* 42(6):e45, 2013 (DOI: 10.1093/nar/gkt1373)