

マウス初期胚におけるDNAメチル化 動態の解析

～高感度LC/MS/MS法による微量サンプルにおける定量的
DNAメチル化解析とエピジェネティクスへの応用～

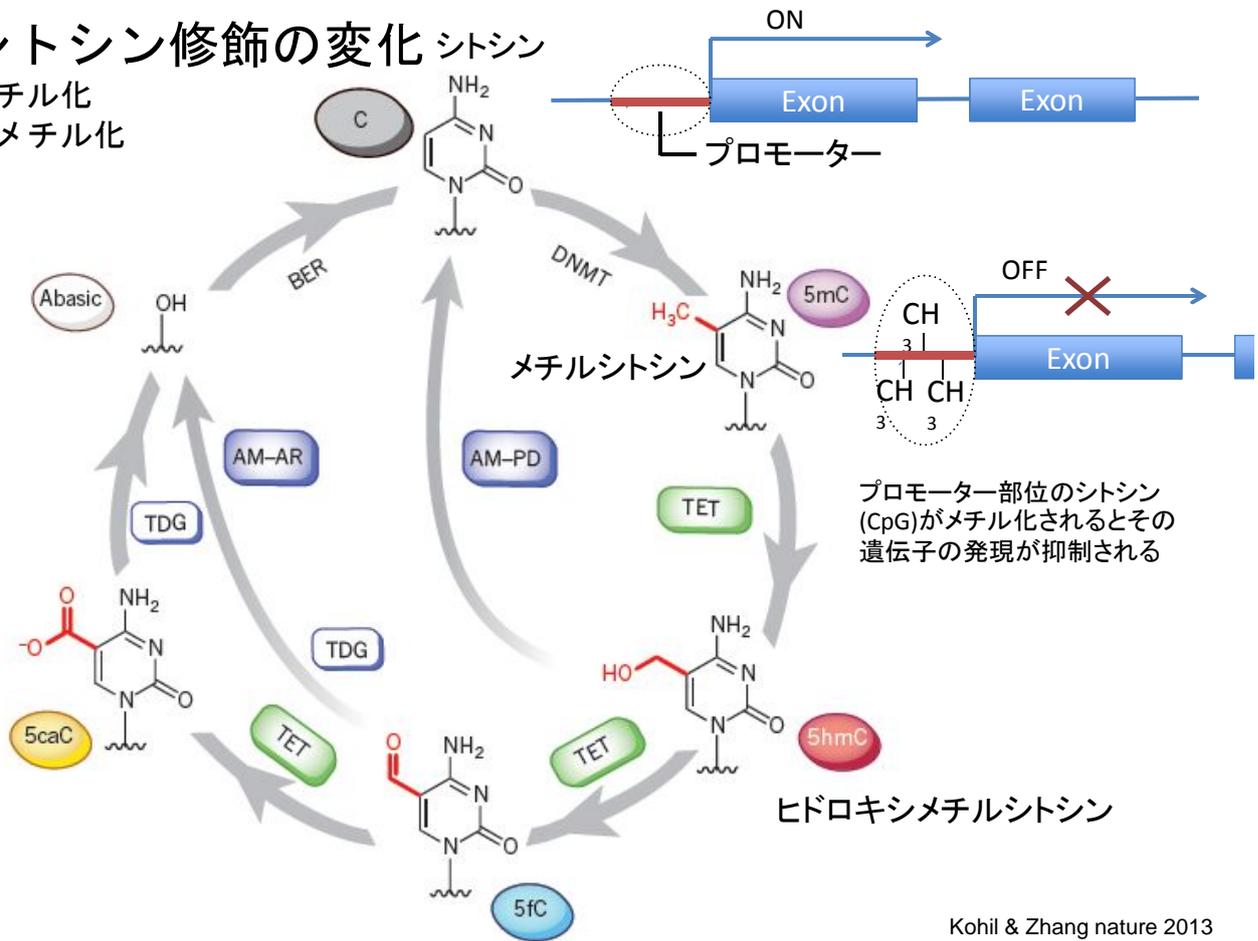
立命館大学薬学部 高田達之
名城大学薬学部 岡本誉士典
関西医科大学医学部 吉田真子

研究のアウトライン

- DNA(シトシン)のメチル化とその制御は、ヒストンのアセチル化とともにエピジェネティックな遺伝子発現調節機構として、胚発生やがん化に重要な役割を持っている。
- 哺乳動物の胚発生において、受精後メチルシトシン(5mC)量の低下とヒドロキシメチルシトシン(5hmC)量の上昇が報告されていたが、従来の検出方法である蛍光抗体法等では、両者の化学量論的な考察ができなかった。
- 10～100個の細胞で5mC, 5hmCの定量解析が可能となる様、LC/MS/MS解析条件を最適化した。
- 本研究成果により、胚発生、細胞分化などのエピジェネティクス研究だけでなく、試料規模が限られた他の生体試料、例えばがんの進行度の評価、がん化学療法におけるDNA修飾のモニタリング等にも応用が可能と考えられる。

シトシン修飾の変化

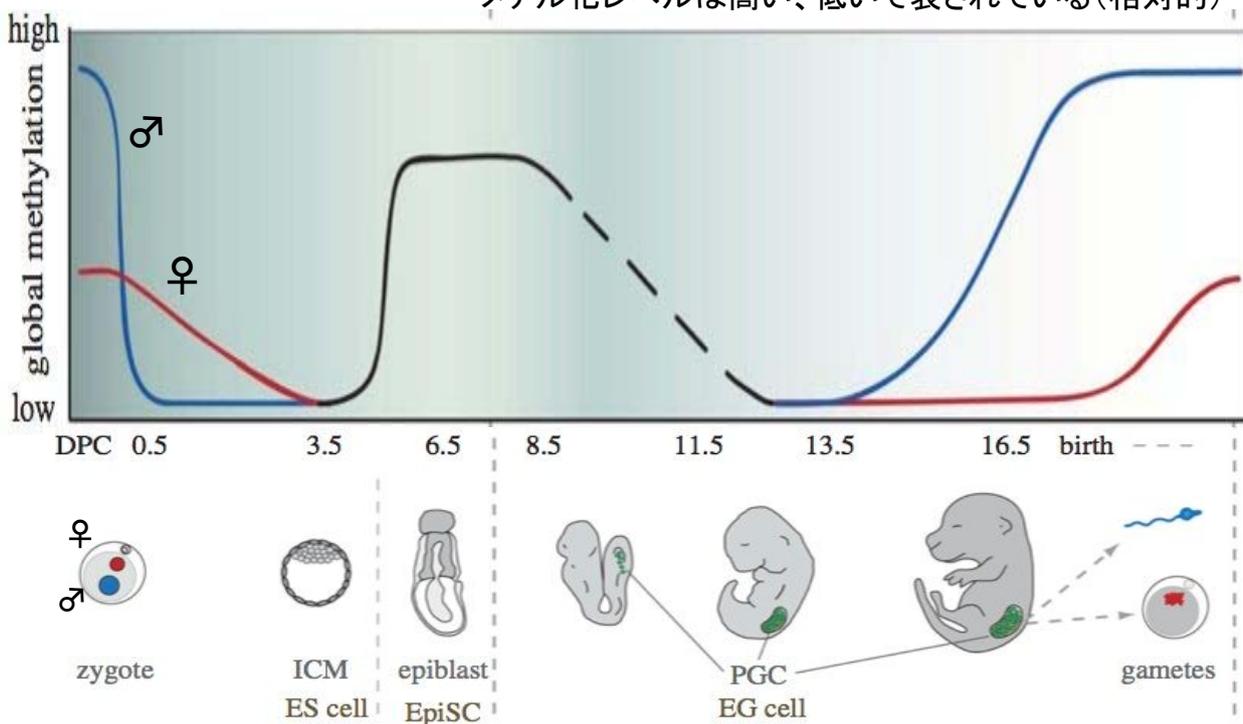
メチル化
脱メチル化



Kohil & Zhang nature 2013

哺乳動物の胚発生におけるDNAメチル化動態

メチル化レベルは高い、低いで表されている(相対的)



Seisenberger 2013. Phil Trans R Soc B 368: 20110330. Fig.1

<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0330>

従来のメチル化解析

- 蛍光抗体法
細胞内の抗原を特異的に認識する抗体を用いてその抗原の分布を調べる。
- バイサルファイトシーケンシング法
ゲノムDNAをバイサルファイト(亜硫酸水素塩)で処理した後、シーケンス解析。
バイサルファイト処理前後で生じるシトシンとチミン(ウラシル)の差異でメチル化がわかる。

問題点

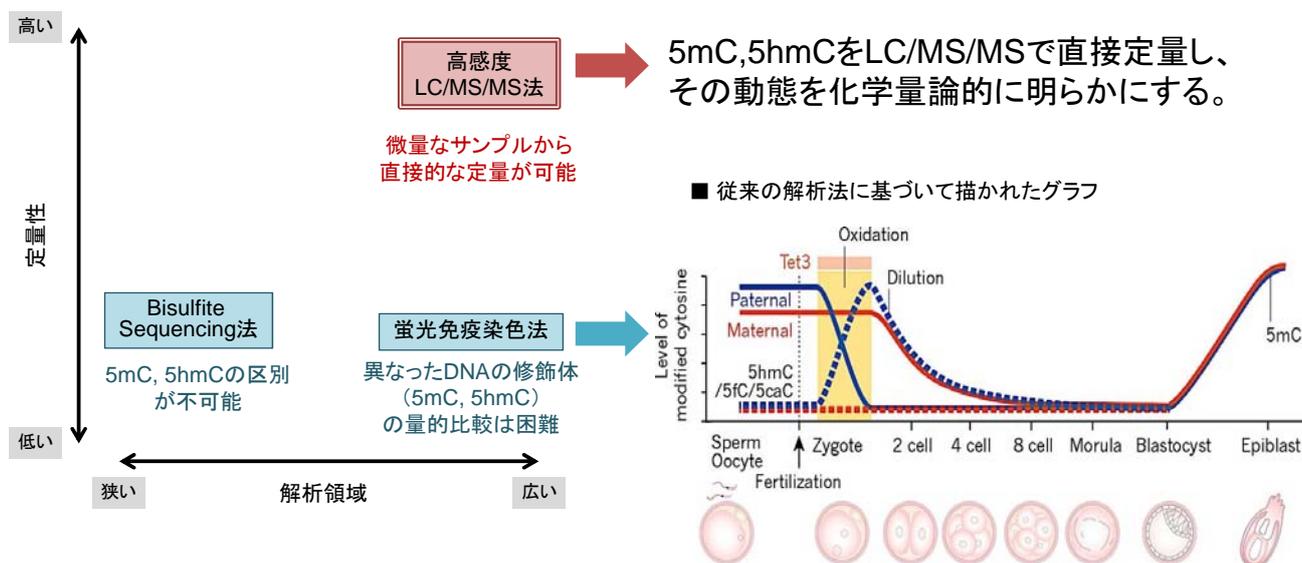
- 定量性が低い
- 5mC, 5hmCの区別、比較が困難

本研究

LC/MS/MSによる微量試料(初期胚)における5mC, 5hmCを直接定量し、その動態を明らかにする。

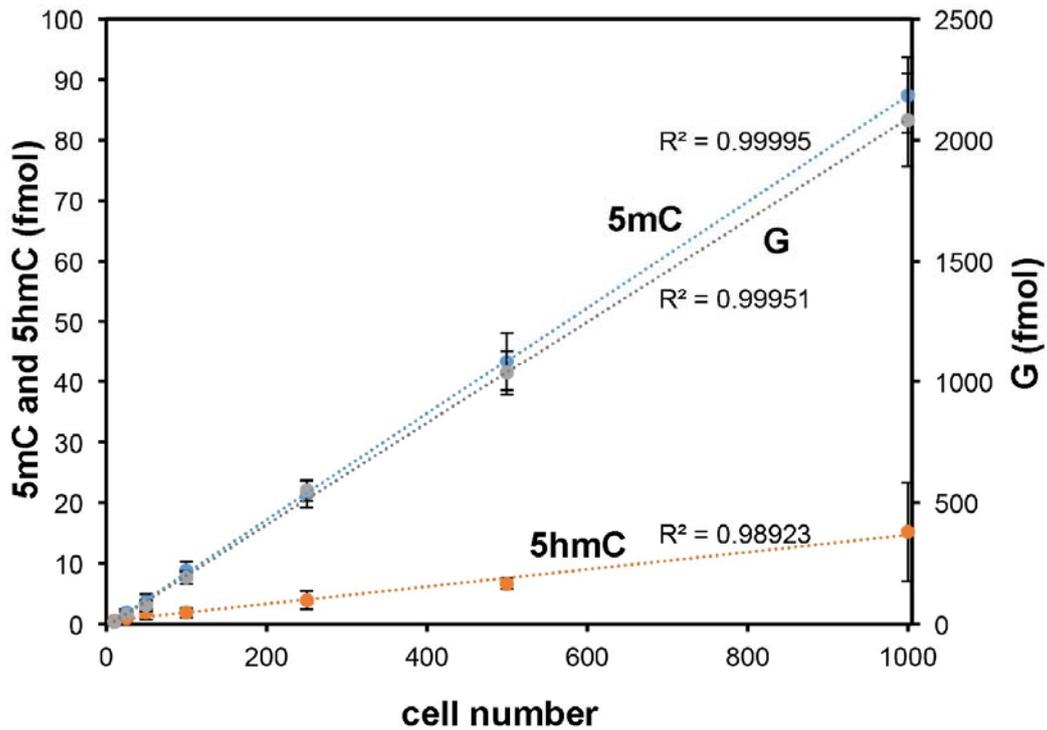
異なる修飾体の絶対量を10~100細胞程度の微量な試料(胚)で解析するためにはアットモル(10の18乗分の1モル)レベルの分析感度が必要。

メチル化DNAの解析法と定量性の比較

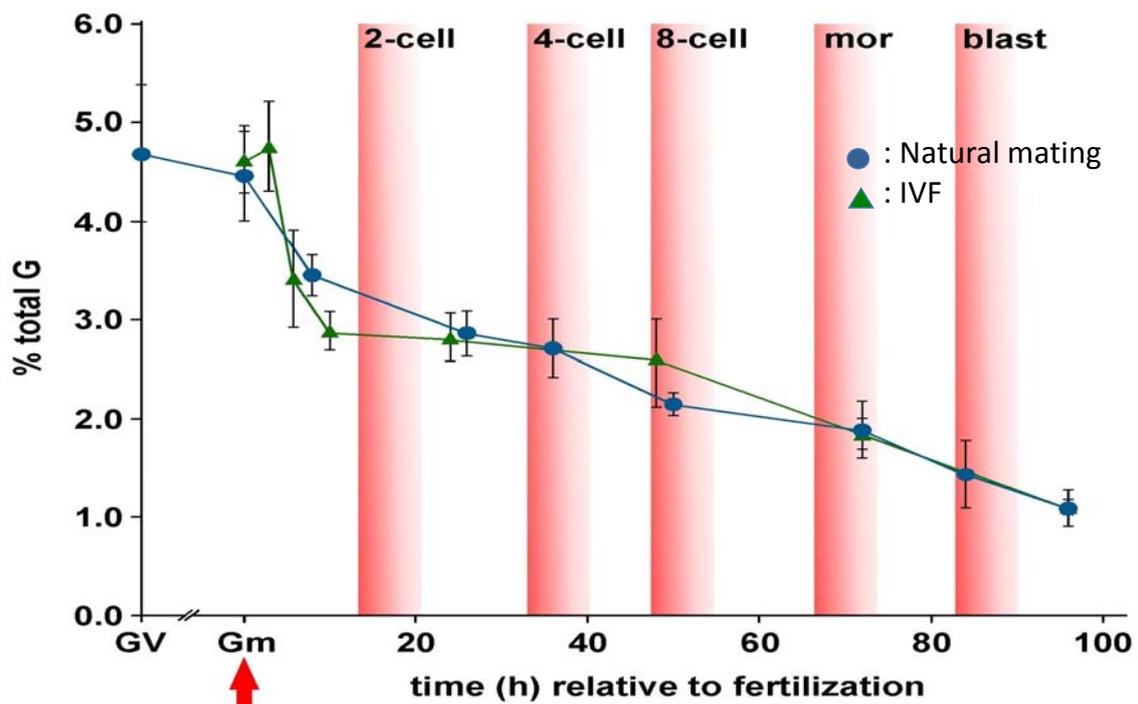


結果

10~100個の細胞数でも分析可能

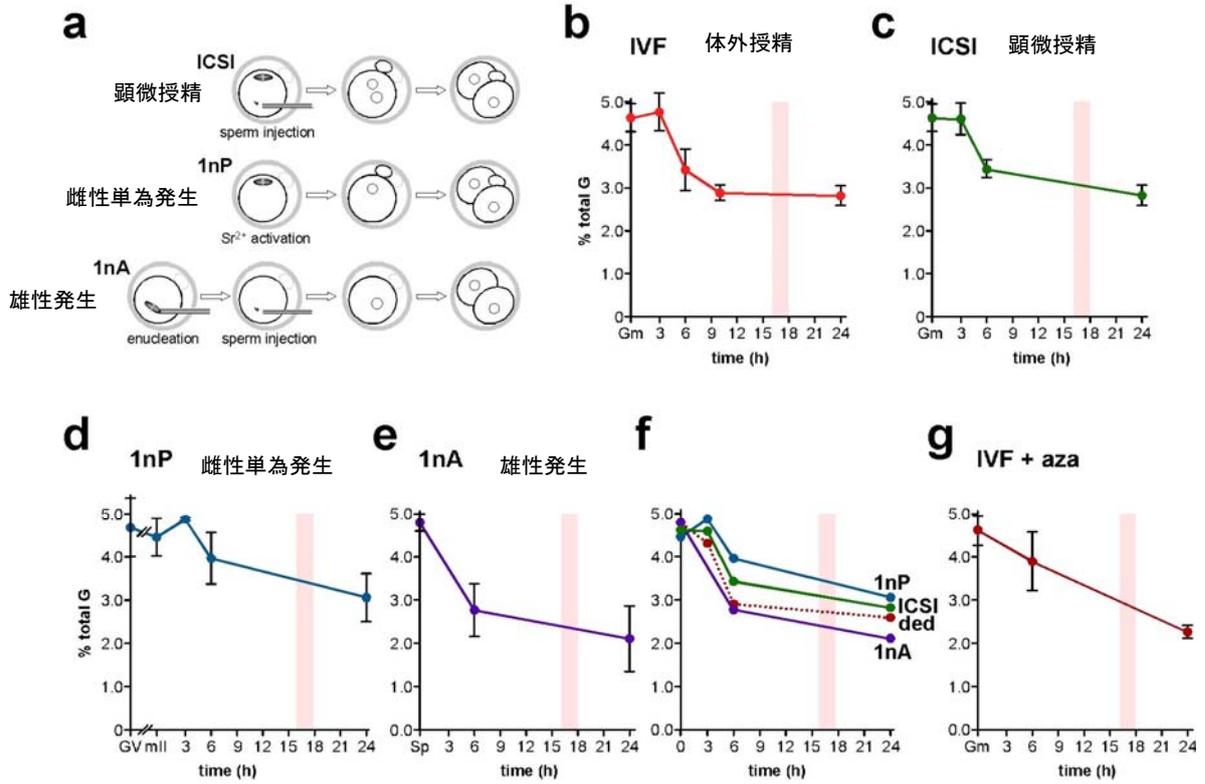


マウス着床前胚発生に伴う5mCの変化



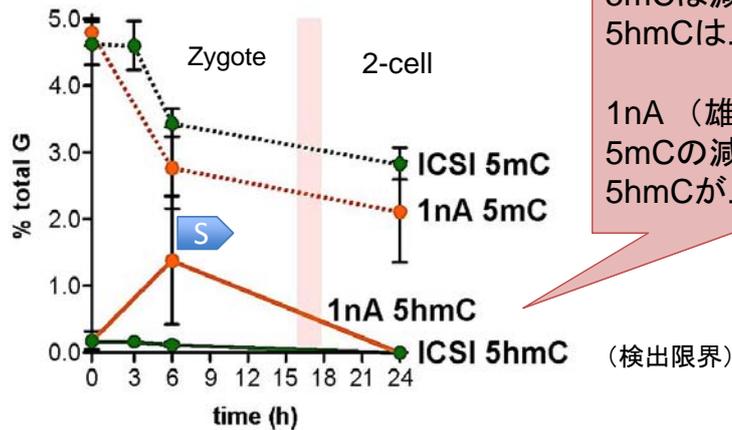
受精後,マウス胚の発生に伴う5mC量を継時的にLC/MS/MSによって定量

人為的に作成した胚の5mCプロファイル



LC/MS/MSによるDNAメチル化定量と従来法との比較

■ 本研究結果

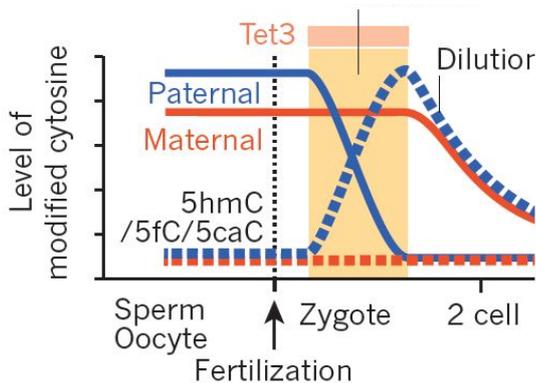


ICSI (顕微授精胚)
5mCは減少するが
5hmCは上昇しない

1nA (雄性発生胚)
5mCの減少に伴い
5hmCが上昇する

(検出限界)

■ 従来の解析法



本研究で明らかになったこと

- 受精後のマウス胚の5mC, 5hmCを定量解析し、それぞれの動態を化学量論的に明らかにした。
 - マウス胚では受精後3-10時間(特に最初のDNA複製前)において5mC量が急激に低下する(能動的脱メチル化)
 - 5hmCレベルは常に低く、5mCの低下に伴う5hmCの上昇は検出されない。
 - 5mCレベルは受精後10-48時間ほとんど変化しない。
 - 受精後48-96時間は直線的に低下し、Blastocystでは、全シトシンの約1%がメチル化された状態である。
- 自然受精、体外受精、顕微授精、雌性単位発生、雄性発生胚における5mC, 5hmCの動態を定量的に解析し、DNAメチル化の視点から胚操作、雌雄ゲノムの機能の違いを明らかにした。
 - 顕微授精は受精後24時間までのDNA脱メチル化に影響しない。
 - 雄性発生胚においてのみ5mCの低下に伴う5hmCの顕著な上昇が検出される。

今後の展望

- 簡便な高感度定量解析法としてエピジェネティクス研究への応用
- クロマチン免疫沈降法との併用による、特定DNA領域の化学修飾の定量
- 試料規模が限られた他の生体試料、例えばがん化学療法におけるDNA修飾のモニタリング等への応用
- がん化、がんの進行度の評価、浸潤領域の確認等への応用
(がん細胞はゲノムが全体的に低メチル化状態)

など