

基礎を築くことができた。

研究成果

【1】脳下垂体の発生・分化に関わる遺伝子のメチル化状態の解析と発現レベルの解析

脳下垂体は、ホルモン産生細胞、幹前駆細胞、支持細胞などの多様な細胞種の集合体であり、脳下垂体特異的な遺伝子発現は下垂体組織を特徴付けるホルモン産生細胞などによっている。そこで、脳下垂体に存在する各細胞種に特異的な遺伝子発現がプロモーターの DNA メチル化により制御されているかどうかを検討するため、ホルモン産生細胞のマーカとなるホルモンをコードする *Gh1*、*Pr1*、*Lhb* 遺伝子、および幹前駆細胞のマーカとなる *Tbx19*、*Pit1* について、ブタ脳下垂体とコントロールとして肝臓を用いてバイサルファイトシーケンス法に依り DNA メチル化解析を行った。ブタ脳下垂体 2 個体分と肝臓 1 個体分について、それぞれ 5 遺伝子のプロモーター領域をバイサルファイト反応後に増幅し、サンガー法による配列解析を行った結果、図 1 に示すように、脳下垂体のみで、下垂体ホルモンをコードする *Gh1*、*Pr1*、*Lhb* 遺伝子と幹前駆細胞のマーカである *Tbx19*、*Pit1* のプロモーターで発現可能な細胞由来と考えられる低メチル化アレル（アレルに含まれる全 CpG のうちの 75%以上が非メチル化 CpG の場合と定義した）が検出された。この解析でみられた DNA メチル化状態と逆相関する下垂体特異的なマーカ遺伝子の発現も下垂体ホルモンをコードする *Gh1*、*Pr1*、*Lhb* 遺伝子と幹前駆細胞のマーカである *Tbx19*、*Pit1* の 5 遺伝子全てにおいて検出できることが確認された（図 2）。バイサルファイト法による DNA メチル化解析では、細胞あたり遺伝子は 2 アレル分ずつ含まれていることから、解析した全アレル中の低メチル化アレルの割合は、相対的に全細胞の中で解析遺伝子を発現できる細胞の割合に近似することができると考えられる。

各ホルモン産生細胞は、脳下垂体組織全体から見ると、それぞれ非常に低い割合でしか存在していないと考えられ、この推定を裏付けるように2個体解析した脳下垂体のうち、*Gh1*、*Prl*では1個体でしか低メチル化アリルが検出されなかった。これと同じ傾向は、幹前駆細胞のマーカである *Tbx19* においても観察された。これは、脳下垂体組織中の全細胞の中で *Gh1*、*Prl* 産生細胞および *Tbx19* を発現する細胞の割合がそれぞれ低いことに起因すると考えられる。これを解決するためには解析するアリル数を増やす必要があると考えられ、これにより割合の低いと考えられる細胞由来のアリルも検出できる頻度を高められると考えられる。

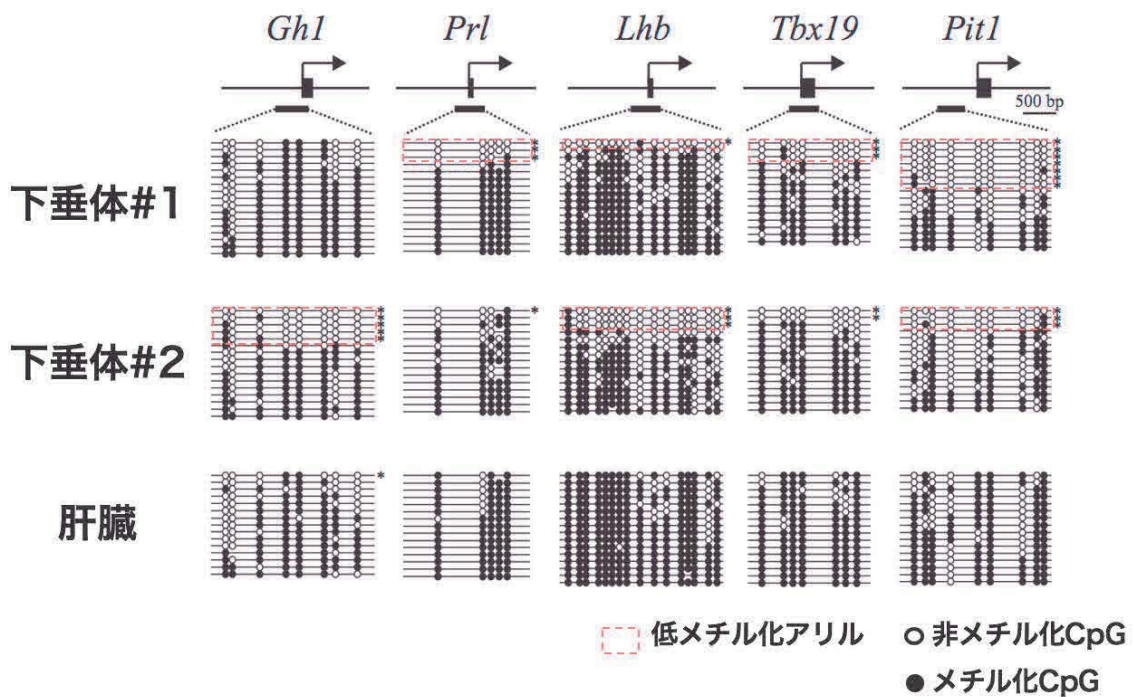


図 1 脳下垂体の幹前駆細胞およびホルモン産生細胞で特異的に発現する遺伝子の DNA メチル化解析 幹前駆細胞マーカである *Tbx19*、*Pit1* およびホルモン産生細胞マーカである *Gh1*、*Prl*、*Lhb* 遺伝子についてバイサルファイトシーケンス法によるプロモーター領域の DNA メチル化解析を行い、肝臓と比較することで脳下垂体由来のゲノム DNA のみでプロモーター領域が低メチル化状態で発現可能なアリル（低メチル化アリル）を検出した。

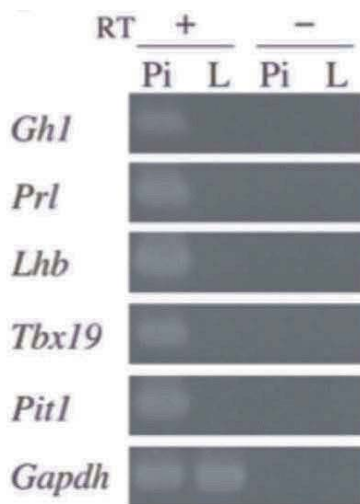


図 2 脳下垂体において低メチル化アレルが検出された遺伝子についての発現パターンの解析 幹前駆細胞マーカーである *Tbx19*、*Pit1* およびホルモン産生細胞マーカーである *Ghl*、*Prl*、*Lhb* 遺伝子について RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行い、低メチル化アレルが検出されなかった肝臓 (L) では全く発現が見られなかったのに対して、低メチル化アレルが検出された脳下垂体 (Pi) では明らかな発現が観察された。

【2】細胞種割合推定および細胞品質評価に向けた低メチル化アレル検出法の最適化

前項で、組織のような複数の細胞種を含む集団内で発現する細胞の割合が低い場合には、その細胞のゲノム DNA に由来する低メチル化アレルの検出感度が低いことが明らかになった。解析するアレル数を増やすことにより割合の低い細胞由来のアレルについても検出感度を高められる可能性が高いが、サンガー法による大腸菌にクローン化した PCR 産物を含むプラスミドのシーケンスでは、解析クローン数 (アレル数) に限界があると考えられた。そこで次に、近年開発が進んでいる次世代シーケンサーによるバイサルファイト PCR 産物のウルトラディープ解析による解析アレル数の大幅な増加により、この問題の解決に取

り組んだ。予備検討から一つのアレル内の CpG のうち 3/4 以上が非メチル化 CpG の場合に低メチル化アレルとするのが妥当であると判明していたため、この実験系確立においても、一つのアレル内で 75%以上が非メチル化 CpG であったものを低メチル化アレルと定義した (図 3A)。

まず、低メチル化アレルの検出感度の確認のための原理証明として、すでにバイサルファイトシーケンスにより低メチル化アレル率がほぼ 0%および 100%であることがわかっているサンプルを混合して実験的に低メチル化アレル率を規定したサンプルについての解析を行った (図 3B)。実際には、ブタ *Sal14* 遺伝子のプロモーター領域で多能性幹細胞特異的に低メチル化を示す領域を用いて、低メチル化アレル率 0%の胎仔線維芽細胞 (PFF)、および低メチル化アレル率 100%の iPS 細胞から抽出したゲノム DNA をそれぞれ 0:100、25:75、50:50、75:25、100:0 の比で混合したのちにバイサルファイト処理して *Sal14* プロモーター領域を増幅することで、実験的に低メチル化アレル率が 100%、75%、50%、25%、0%になるサンプルを調製した。これらの混合サンプルにバイサルファイト処理を施し、*Sal14* プロモーター領域を増幅した PCR 産物をウルトラディープシーケンスに供した。その結果、それぞれのサンプルについて 843-1807 アレル(リード) とサンガー法と比較して圧倒的に多くのアレルについての解析を行うことができた。低メチル化アレル率についても期待通りに 100%、75%、50%、25%、0% となる結果を得ることができた (図 3C)。次にサンガー法での解析結果から、低メチル化アレル率が低い (発現可能な細胞割合が低い) 場合に低メチル化アレルの検出感度が低かったことから、実験的に PFF と iPS のゲノム DNA を 90:10 で混合して実験的に *Sal14* プロモーター領域で低メチル化アレル率 10%のサンプルを調製して同様のウルトラディープシーケンスを 2 回行った。2 回の試行の結果、それぞれ 1, 109、1, 447 リード (アレル) が得られ、それを模擬的に連続する 10、20、50、100、200 リード (アレル) ずつの 5 グループに分け、擬似

的にサンガー法で10、20、50、100、200 クローンの解析を5回ずつ行ったときの低メチル化アリの検出感度を検討した(図3D)。その結果、10-50 リードまでのグループについては、5回の平均ではいずれのグループでも10%前後と *Sal114* プロモーター領域で期待される低メチル化アリル率に近かったものの、標準偏差が大きかったことから、各試行においては安定して10%では検出されにくいことも明らかになった。これに対して、100、200 リードの解析グループでは、5回いずれも期待される10%の低メチル化アリル率が検出できた。この結果から、バイサルファイトシーケンス法により組織中に発現可能な細胞が10%程度存在する(低メチル化アリル率10%に相当すると考えられる)サンプルでは、100 リード(アリル)以上を解析することで安定的な結果が得られることが明らかになった。以上の検討結果から、ウルトラディープバイサルファイト解析では、100 リード(アリル)以上のリード数が得られたものについて解析することとした。また、低メチル化アリル率が50%と比較的高いサンプルについては、20 リード(アリル)程度の少数のリードの解析でも安定した検出結果が得られることも明らかになった(図3E)。

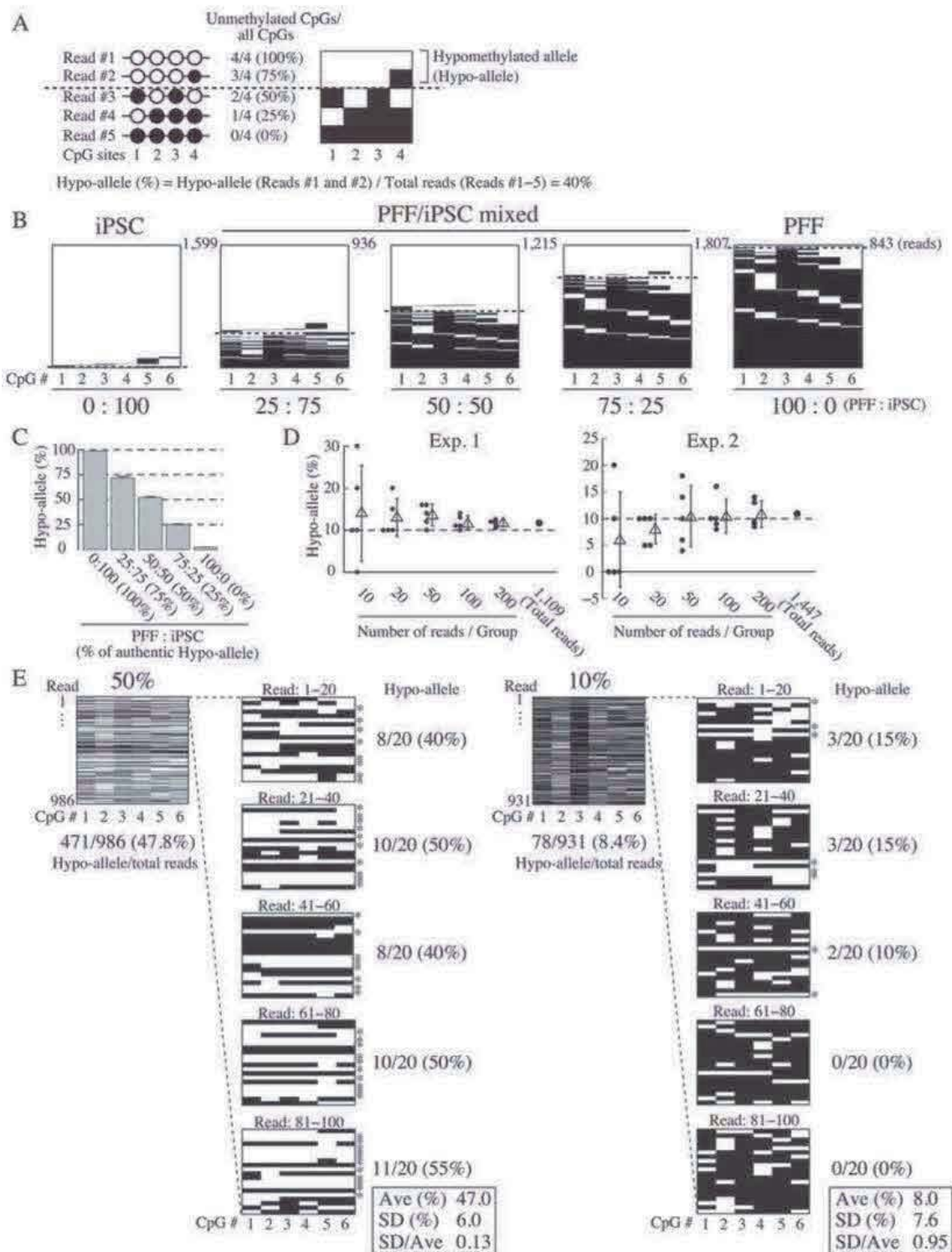


図3 MiSeq ウルトラディープシーケンスによる低メチル化アレル (Hypo allele) の検証

(A) シーケンスされた一つのリードの中で、75%以上の CpG が非メチル化 CpG (A に示した 5 リードについては、4 つある CpG のうち 3 つまたは 4 つが非メチル CpG の場合) に、

低メチル化アリル (Hypo-allele) として定義した。5つの仮想的なリードのうち、1と2がHypo-alleleで、低メチル化アリル率は40% (2リード/5リード) である。左パネル：従来のCpGメチル化分析データ；白丸および黒丸はそれぞれ非メチル化およびメチル化CpGを示す。右パネル：MiSeq ウルトラディープ解析；白および黒の線は、それぞれメチル化されていないCpGおよびメチル化されたCpGを示す。(B) PFF および iPSC 由来のゲノム DNA の混合物を用いた *Sall4* T-DMR での MiSeq ウルトラディープシーケンスによる低メチル化アリル解析の検証。点線より上のリードは、低メチル化アリルである。白および黒の線は、それぞれメチル化されていないCpGおよびメチル化されたCpGを示す。PFF および iPSC のゲノム DNA の混合物 (0 : 100、25 : 75、50 : 50、75 : 25 または 100 : 0) で予想されるそれぞれの低メチル化アリル率は100%、75%、50%、25%、または0%である。(C) ウルトラディープシーケンスにより解析した *Sall4*T-DMR の低メチル化アリル率。低メチル化アリル率は、B に示す PFF / iPSC 混合物 (100%、75%、50%、25%、および0%と予想される低メチル化アリル率) から計算した。3回の独立した実験からの低メチル化アリル率は平均±SE (n = 3) として示した。(D) *Sall4* T-DMR における MiSeq データに基づいたリード数と低メチル化アリル率 (10%) の検出精度。この解析のために、PFF および iPSC のゲノム DNA を 90:10 で混合し、低メチル化アリル率 10%となる実験的なサンプルを調製した。2回の独立した MiSeq 解析から、1,109 リード (実験 1) および 1,447 リード (実験 2) が得られた。10、20、50、100 または 200 リードの場合のそれぞれについて、各試行の低メチル化アリル率をプロットし (黒塗りの丸、n = 5)、5回の試行の平均±SD を三角形とエラーバーでプロットした。(E) *Sall4* T-DMR における MiSeq データを用いた少数リードの従来のバイサルファイトシーケンスによる低メチル化アリル率 (10%または50%) の検出精度の検討。PFF および iPSC のゲノム DNA を、それぞれ 10%または50%の低メチル化アリル率となるよう 90:10 または 50:50 で混合した。MiSeq データの生データから、連続する 20 リードを 1 グループとして、1回のサンガー法によるバイサルファイトシーケンス解析結果に見立て、1- 100 番目のリードを 5 グループに分けた。20 リード群

の低メチル化アレル率を計算した。*は低メチル化アレルを示す。白および黒の線は、それぞれ非メチル化 CpG およびメチル化 CpG を示す。

次に実際に生体サンプルで期待される低メチル化アレル率が検出可能かどうかの検討を行った。ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子は、各細胞内に二つある遺伝子のうちの父方由来または母方由来のアレルが DNA メチル化による抑制を受けることが知られている。ゲノム中で 100 遺伝子程度がゲノムインプリンティングを受けると言われており、ブタでは *Meg3* および *Peg10* 遺伝子で由来する親の性に依存して DNA メチル化を受けるメチル化可変領域が知られている。これらの遺伝子のメチル化可変領域は組織から抽出したゲノム DNA からバイサルファイトシーケンス解析を行った場合、どちらか一方の親由来のアレルのみがメチル化を受けるため、低メチル化アレル率が 50%として検出されることが期待される。そこで、ブタ脳下垂体 2 個体分と肝臓 1 個体分のゲノム DNA を用いて *Meg3* および *Peg10* のメチル化可変領域についてのウルトラディープバイサルファイトシーケンスを行った (図 4)。その結果、脳下垂体 2 個体、肝臓 1 個体のいずれにおいても、期待される頻度に近い低メチル化アレルを検出することができた。これにより、実験的に低メチル化アレルの比を調整したサンプルだけでなく、実際に生体内に存在する状態の遺伝子についても期待される頻度で低メチル化アレルを検出できることが明らかになった。

以上より、バイサルファイト PCR と次世代シーケンサーによるウルトラディープ解析を組み合わせ、各 PCR 産物当たり 100 リード (アレル) 以上の解析を行うことで、複数の細胞種を含む集団内で存在割合の低い細胞種についても低メチル化アレルが感度良く検出できる実験系を構築することができた。

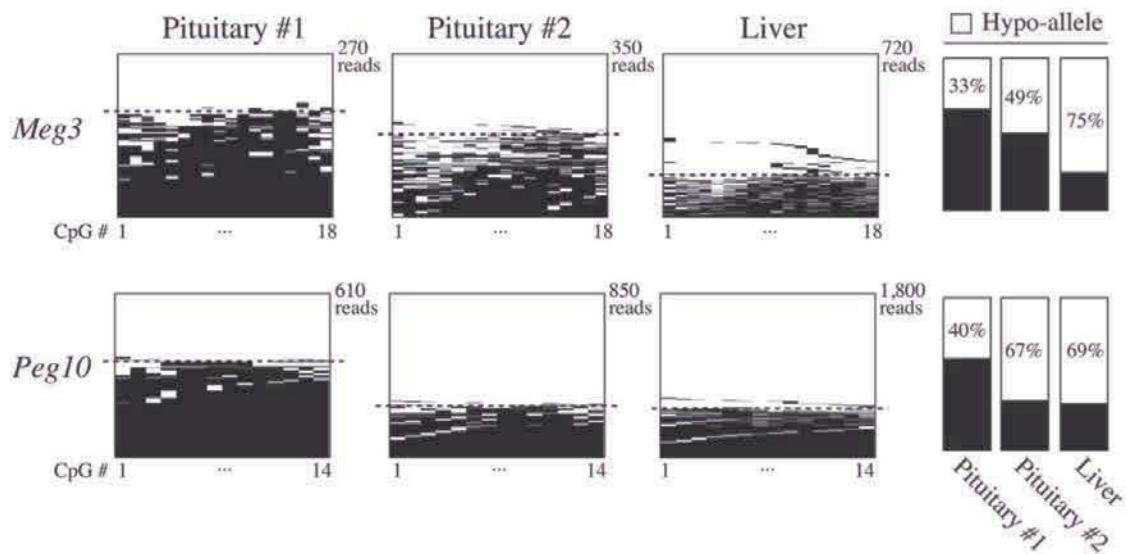


図4 内在性遺伝子についての低メチル化アリル (Hypo allele) 検出精度の検証

内在性のインプリント遺伝子で50%の低メチル化アリル率となることが期待される *Meg3* および *Peg10* 遺伝子についてウルトラディープシーケンス解析を実施した。脳下垂体2個体分と肝臓1個体分について、*Meg3* および *Peg10* 遺伝子プロモーターの低メチル化アリル率を図3と同様に計算した。点線より上のリードは低メチル化アリルである。白および黒の線は、それぞれメチル化されていない CpG およびメチル化された CpG を示す。

【3】脳下垂体のメチル化状態の網羅的解析と他組織とのメチル化プロファイルデータの統合

下垂体機能および発達に関連する遺伝子の T-DMR を決定するために脳下垂体で細胞種特異的に発現する遺伝子を中心に MiSeq によるウルトラディープバイサルファイトシーケンス解析を行った。脳下垂体2個体分を用い、対照として肝臓、大脳、胎仔線維芽細胞 (PFF) をそれぞれ1個体分ずつ解析した結果、37遺伝子については解析した全組織で100リード (アリル) 以上が検出できたため、以降の解析ではこの37遺伝子についての詳細な解析を行った (図5)。5種類の組織/細胞 (脳下垂体#1 および#2、肝臓、脳および PFF) を用いて37遺伝子からの検出されたリード (アリル) 数の平均は3,832-6,321であり、37遺

伝子のうち 25 については、5 組織/細胞の全てにおいて 1,000 を超えるリードが検出された。次世代シーケンシングで得られた低メチル化アレル率 (%) をヒートマップとして示し、階層的クラスタリング解析を行った (図 5)。2 個体分の下垂体 (#1 および #2) は、どちらも低メチル化アレル率が同程度に再現よく検出され、下垂体以外の 4 組織/細胞は異なる区分に明確に分けることができた (図 5 左パネル)。一方で、脳下垂体関連遺伝子を中心に解析したにも関わらず、従来の DNA メチル化率 (%) に基づく DNA メチル化解析では、PFF のみが単一の区分となり、PFF と比較した下垂体は肝臓および脳と同じ区分になってしまうことが明らかになった (図 5 右パネル)。これらの結果から、脳下垂体関連遺伝子を用いた下垂体組織の分類には、低メチル化アレル率を用いることで、従来の DNA メチル化率に基づく解析よりも正確な結果が得られることが明らかになった。

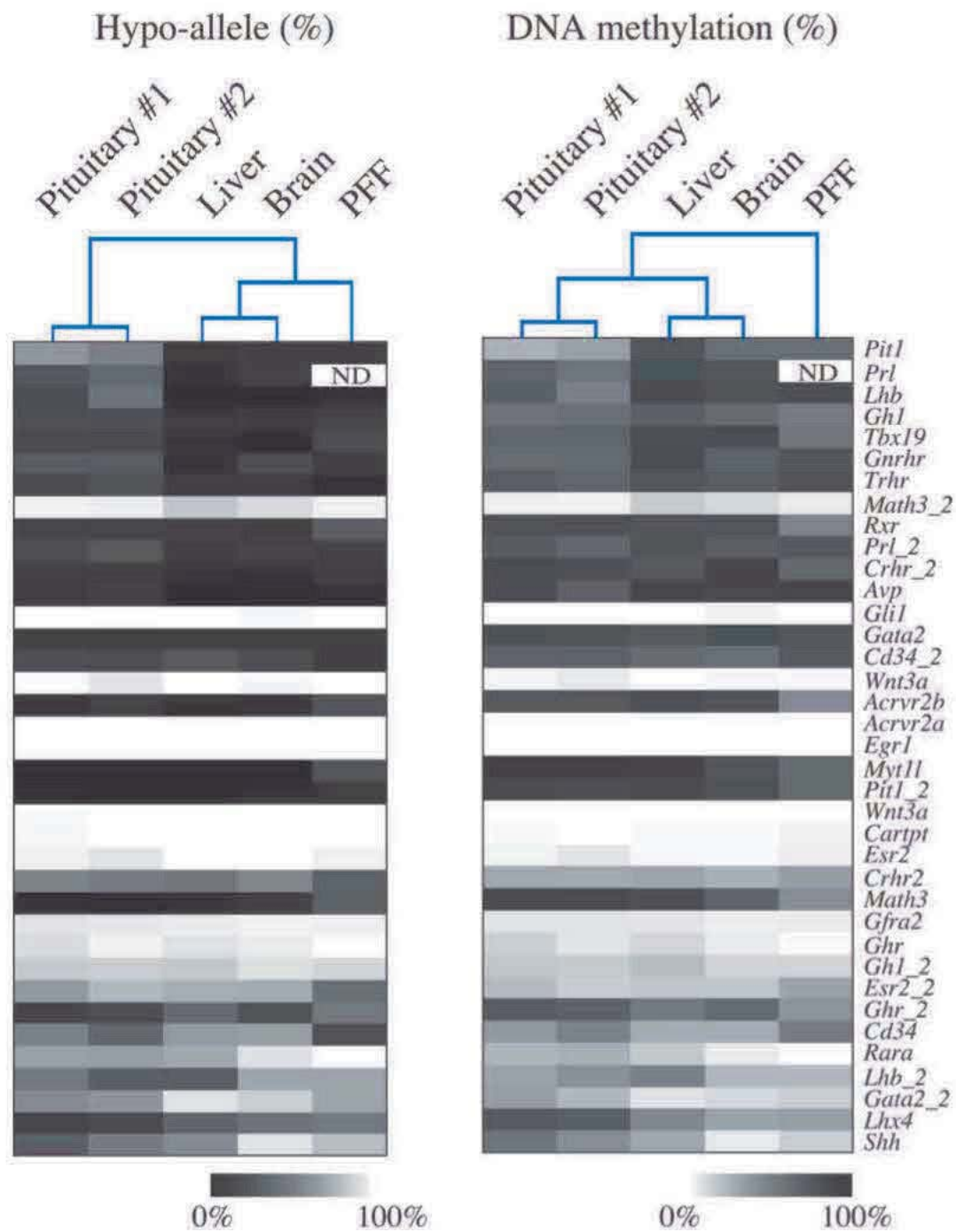


図5 ブタ組織におけるウルトラディープバイサルファイトシーケンス結果を従来のメチル化率と本研究で確立した低メチル化アレル率をもとに比較の検討

従来の DNA メチル化率による解析と本研究で提唱した低メチル化アレル率による解析によるウルトラディープバイサルファイトシーケンスによるブタ組織における下垂体関連遺伝子の DNA メチル化プロファイルの比較。 脳下垂体 (#1 および #2)、肝臓、脳、および PFF

において、MiSeq シーケンサーを用いて、37 種の下垂体関連遺伝子のメチル化率と低メチル化アレル率を解析した。各組織の低メチル化アレルデータは、ユークリッド距離（左パネル）に基づく階層的クラスタリング後のヒートマップとして示した。同じシーケンスデータを使用して、メチル CpGs / 全 CpGs によって計算される従来の DNA メチル化率による解析についても、階層的クラスタリングとともにヒートマップとして示した（右パネル）。ND、データなし。

次に、下垂体関連遺伝子プロモーターT-DMR の 5 領域について低メチル化アレル率を検討した（図 6A）。*Tbx19* および *Pit1* は、ホルモン産生細胞の前駆細胞で発現する。*Tbx19* 陽性細胞はコルチコトロフに分化し、*Pit1* 陽性細胞はソマトトロフ、乳酸栄養剤またはゴナドトロフに分化する。次世代シーケンサーによる 5 遺伝子の DNA メチル化解析からは、これらの遺伝子を発現していない肝臓ではほとんど低メチル化アレルが検出されなかったのに対して（0-6%）、高発現組織である下垂体（#1 および #2）では低メチル化アレル率が高い（11-63%）ことが明らかになった（図 6B）。これは、下垂体組織で検出された低メチル化アレルが遺伝子発現と相関することを示唆している。対照的に、従来の DNA メチル化率（メチル化 CpG / 全 CpGs）による解析では、*Pit1* を除いて、下垂体と肝臓との間で解析した下垂体関連遺伝子の 5 領域の T-DMR の DNA メチル化率に明確な差は見られなかった。下垂体 #1 と #2 との間では、*Pr1* および *Lhb* の低メチル化アレル率にある程度の差が見られた。下垂体 #1 および #2 は、それぞれ雌および雄のブタ由来であり、雄ブタは出生直後に去勢されている。これによりこの去勢雄では、雄性生殖腺からの性ホルモン分泌の欠如により、下垂体組織における *Pr1* および *Lhb* 産生細胞の数が正常とは異なる可能性も考えられる。この研究では、予備検討結果を踏まえて次世代シーケンシングで 100 リード以上のデータが得られた領域についての低メチル化アレルデータを使用した。本

研究の結果は、図 1 で示した約 20 クローン (アリル) 程度の従来のサンガー法による解析では、低メチル化アリル率が低い場合に解析アリル数の不足による検出感度の低下が考えられた。そこで図 1 での解析した 5 遺伝子のうち、3 種の下垂体関連遺伝子 (*Ghl*, *Pr1* および *Tbx19*) の低メチル化アリル率について、ウルトラディープ解析の結果をもとに詳細に検討した (図 6A)。 *Ghl* では、ウルトラディープシーケンシングによって下垂体#1 の低メチル化アリル率は 17%であったが、サンガー法で解析した 17 クローン (アリル) の結果では低メチル化アリルは検出されなかった。さらに、サンガー法による下垂体#1 および #2 の *Pr1* 遺伝子座における低メチル化アリル率 (それぞれ 18.8% および 6.7%) は、ウルトラディープシーケンシング (図 6B) で推定された割合 (22% および 34%) との差が大きかった。この結果と予備検討結果を踏まえると、MiSeq を用いた約 1000 リード (アリル) のウルトラディープシーケンシングデータは、サンガー法による約 20 クローン (アリル) の解析と比較して、ウルトラディープシーケンシングデータによる低メチル化アリルデータの方が非常に検出感度、精度が高いことを示唆している。また、サンガー法によって得られた配列から算出した DNA メチル化率 (メチル CpG / 全 CpG) では、下垂体と肝臓との間に顕著な差異が見られなかった。したがって、MiSeq を用いたウルトラディープ解析により各遺伝子座について 100 リード (アリル) 以上の解析が可能になった。以上より、組織中である遺伝子を発現する細胞の割合が低い場合にも、次世代シーケンサーにより 100 リード (アリル) 以上の解析を行うことでサンガー法の限界による不具合を克服することができたことから、ウルトラディープ解析はその遺伝子で T-DMR を決定するための有用なアプローチであると結論付けた。

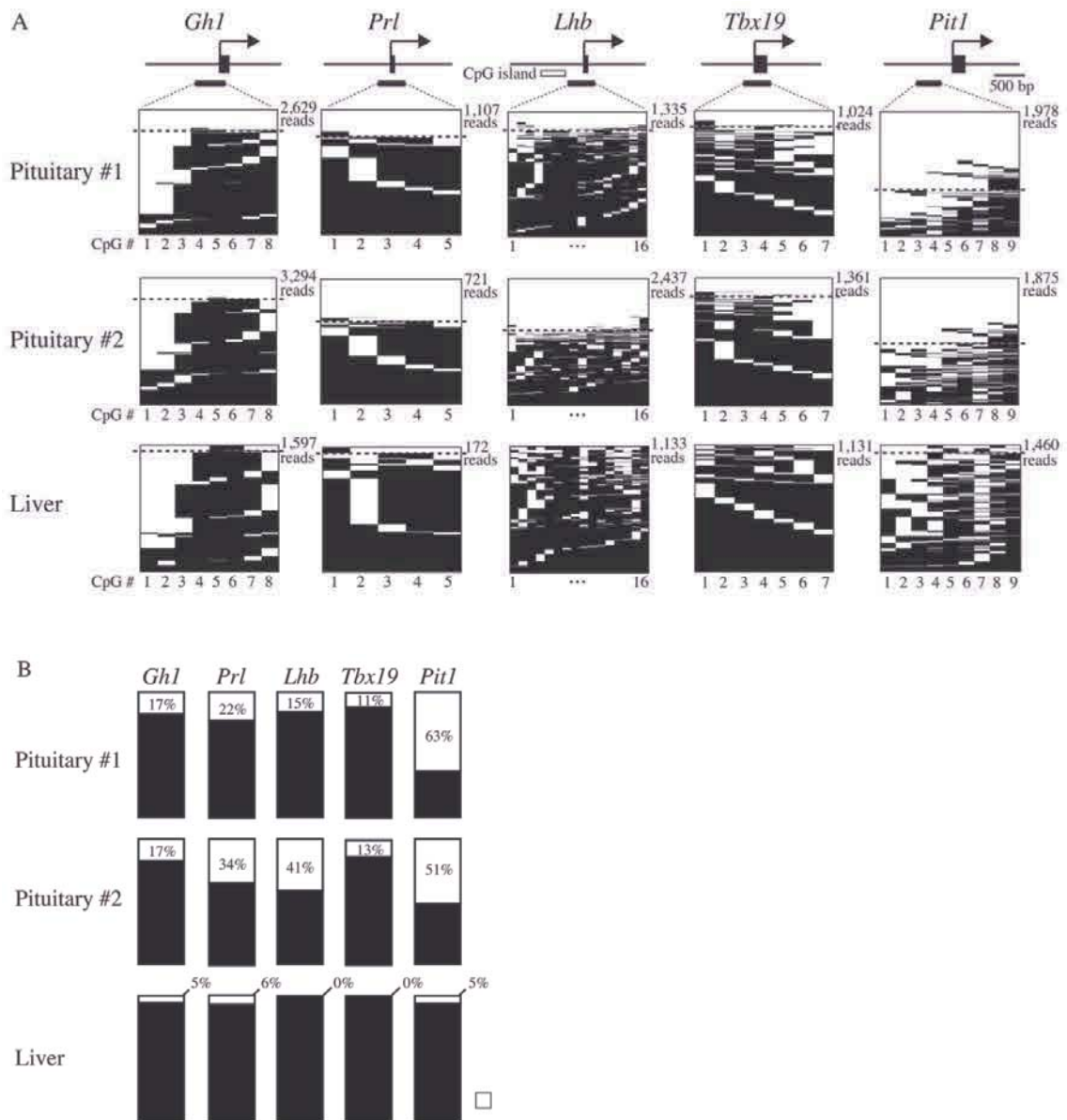


図6 脳下垂体の細胞種特異的遺伝子における5遺伝子T-DMRの低メチル化アリアル率の解析

(A) *Ghl*、*Prl*、*Lhb*、*Tbx19*および*Pit1*のDNAメチル化可変領域について、MiSeqシーケンサーを用いて解析した。図中の各リード（アリアル）の線は、その位置のCpGで非メチル化（白）またはメチル化（黒）CpGの状態を示す。点線より上のリードは低メチル化アリアルを示す。パネル下の数字はバイサルファイトPCR産物中のCpGの位置を示す。(B) 図5AのMiSeqデータに基づく低メチル化アリアル率(%)をまとめた棒グラフで示した。

【4】下垂体ホルモン標的組織での非コードRNAを中心としたエピゲノム改変

法の確立

脳下垂体から分泌される成長ホルモンは筋肉を標的組織の一つとしており、本研究で用いたブタにおいては、食肉としての骨格筋の発達は重要な課題である。TGF- β スーパーファミリーに属するミオスタチン (*MSTN*) は主に骨格筋細胞から分泌され、筋芽細胞の増殖抑制、骨格筋分化抑制に働く。さらに、ミオスタチンは脂肪生成にも関与することから *MSTN* の発現細胞および量の調節は、畜産において高品質な食肉生産につながる可能性が考えられる。そこで、エピジェネティックな遺伝子発現抑制機構である DNA メチル化を中心に、*MSTN* 遺伝子の発現との関係を解析した。

まず、ブタ主要組織における *MSTN* 転写開始点近傍の DNA メチル化状態と mRNA の発現状態の解析を行った (図 7)。その結果、*MSTN* mRNA は期待された通り骨格筋のみで顕著な発現が観察され、それ以外の繊維芽細胞、脂肪、心臓、肝臓では発現が観察されなかった。また、バイサルファイトシーケンス法による DNA メチル化解析では、*MSTN* 転写開始点近傍は骨格筋のみで低メチル化状態である T-DMR (組織特異的 DNA メチル化可変領域) が存在することが明らかになり、それ以外の繊維芽細胞、脂肪、心臓、肝臓では高メチル化状態で発現が抑制されていることが示唆された。

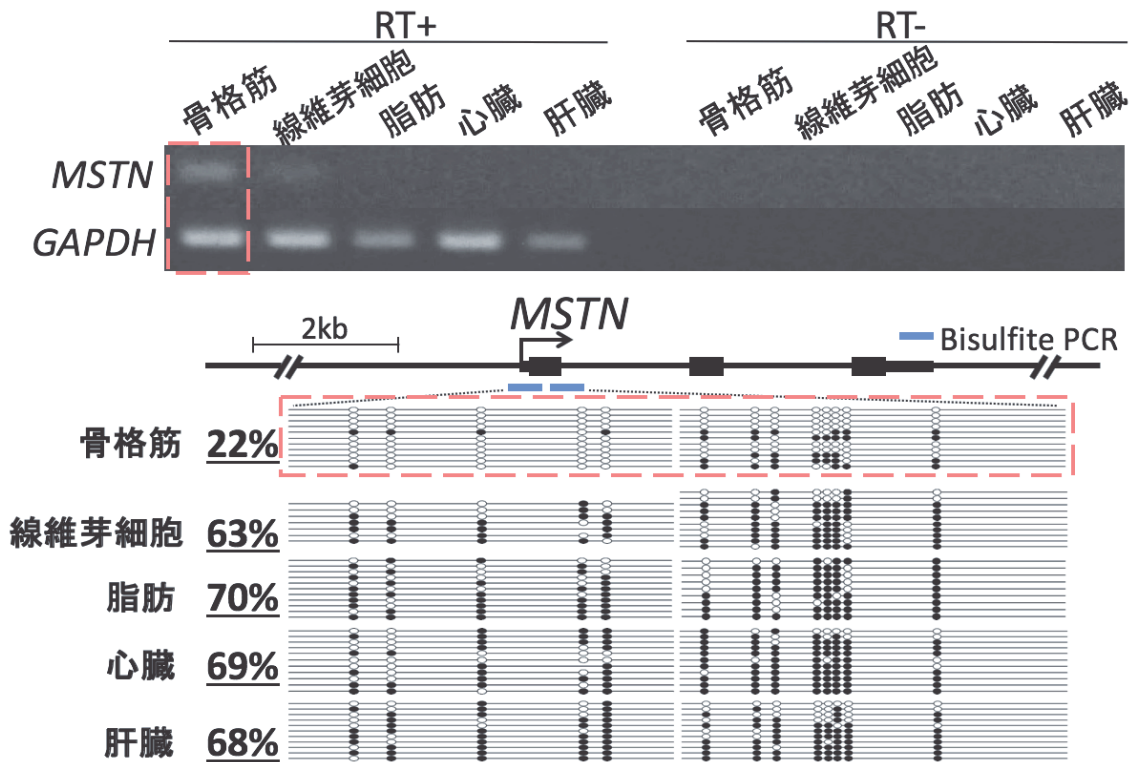


図7 *MSTN*遺伝子における組織特異的な mRNA 発現および転写開始点近傍の DNA メチル化解析

上のパネルは *MSTN* mRNA 発現パターンを RT-PCR 法による結果で、*MSTN* (上段) および内部標準として *GAPDH* (下段) の解析を行った。全 RNA から逆転写した cDNA (RT+) を鋳型として骨格筋のみでの顕著な発現が確認され、それ以外の線維芽細胞、脂肪、心臓、肝臓ではほぼ発現が見られなかった。下のパネルは *MSTN* 転写開始点近傍の DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンス法により解析したもので、骨格筋のみでメチル化率が 22%と低メチル化状態であったのに対して、その他の線維芽細胞、脂肪、心臓、肝臓では 63-70%と高メチル化状態であった。この結果から DNA メチル化によって骨格筋以外での *MSTN* 発現が抑制されていることが強く示唆された。エクソン 1 を含むプロモーター領域にバイサルファイト PCR 用プライマーを 2 カ所に設計し、PCR 産物のサブクローニング後にサンガー法による配列決定から各 CpG のメチル化状態を判定した。白丸は非メチル CpG、黒丸はメチル CpG を示す。組織名の隣の数値は、メチル化 CpG/全 CpG から算出したメチル化率を示す。

次に、T-DMR を含む *MSTN* プロモーターの活性をレポーターアッセイで解析した (図 8)。転写開始点近傍のみの Region1、転写開始点近傍から上流の EST (lincRNA) 存在部も含む Region2 について解析した結果、どちらもコントロールに比べて有意に高いルシフェラーゼ活性を示したことから、この領域はプロモーターとして機能することが明らかになった。さらにどちらの領域においても領域内の CpG をメチル化したコンストラクトの導入では、ルシフェラーゼ活性の顕著な低下が観察されたことから、DNA メチル化によりプロモーター活性が低下したことも明らかになった。この結果から、DNA メチル化は *MSTN* の発現抑制に働いていることがわかった。

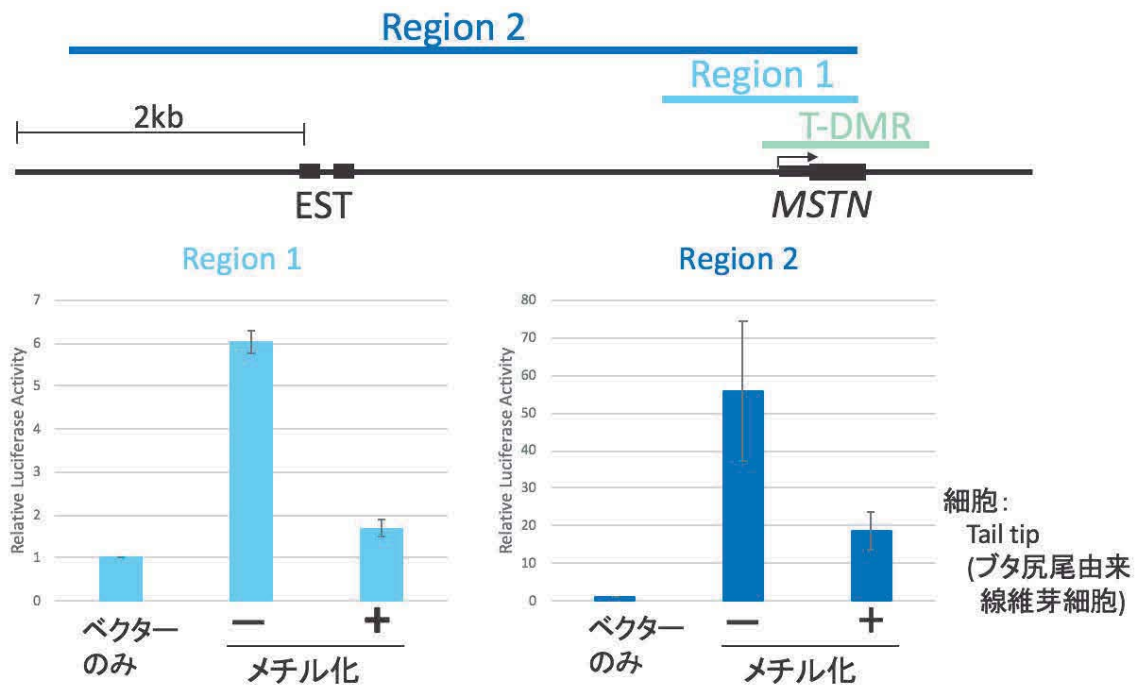


図 8 *MSTN* 遺伝子プロモーター活性の検出と DNA メチル化がプロモーター活性に与える影響の解析

上のパネルはゲノム上での *MSTN* エクソン 1 上流のプロモーター領域の模式図を示す。エクソン 1 を含む転写開始点近傍に T-DMR (組織特異的 DNA メチル化可変領域) が検出され、T-DMR を含む Region1、およびさらに上流まで含む Region2 をブタゲノム DNA

より Long PCR 法により増幅してクローニングし、CpG フリールシフェラーゼベクターに導入した。EST は *MSTN* 遺伝子の上流で *MSTN* mRNA とは逆方向に転写される長鎖非コード RNA (lincRNA) で、この RNA 領域を含む Region2 についてもプロモーター活性の測定に用いた。下のパネルは CpG フリールシフェラーゼベクターに Region1 または Region2 をつないだものをブタ尾部より樹立した繊維芽細胞に導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した (メチル化-)。Region1 または Region2 内の CpG を SssI メチレーンによりメチル化したルシフェラーゼベクターについてもシフェラーゼ活性の測定を行った (メチル化+)。グラフの縦軸は、プロモーターを含まないベクターのみを導入したときのシフェラーゼ活性を 1 とした相対値で示した。

MSTN 転写開始点上流約 3 kb の位置には、EST として長鎖遺伝子間非コード RNA (lincRNA) がブタデータベースに登録されている。そこで、この lincRNA が実際に転写されているのかを確認するために lincRNA のエクソンと予想される領域内に RT-PCR 用のプライマーを設計して解析を行った (図 9)。その結果、lincRNA は骨格筋以外の組織で明瞭な発現が見られ、増幅長およびクローン化後の配列解析から予想されるエクソン-イントロンの境界でスプライシングを受けていることもわかった。この lincRNA の発現パターンは、*MSTN* mRNA の発現パターンとは逆相関することも明らかになった。

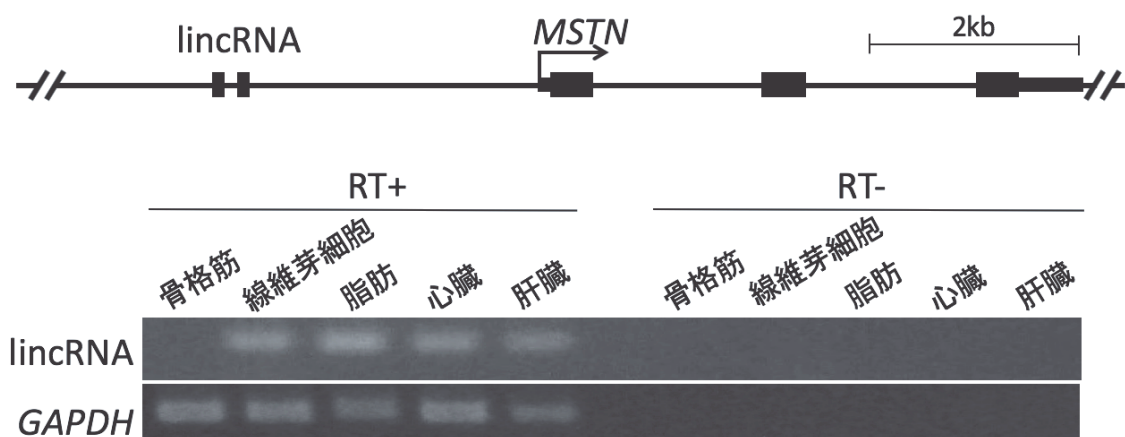


図9 *MSTN* 遺伝子上流で逆向きに転写される長鎖遺伝子間非コード RNA (lincRNA) の発現パターンの解析

上のパネルはゲノム上での *MSTN* 遺伝子領域のゲノム構造を示す。*MSTN* 上流のプロモーター領域内に *MSTN* 遺伝子とは逆方向に転写されるアンチセンス RNA として lincRNA の存在が示唆されたため、lincRNA のエクソンと予想される領域に RT-PCR 用のプライマーを設計し、骨格筋を含むブタ組織での発現状態を解析した。*MSTN* mRNA は骨格筋のみで顕著な発現が見られたが、lincRNA はこれと逆相関し骨格筋のみで発現が見られなかった。

同定した lincRNA が、*MSTN* mRNA の発現パターンとは逆相関することが明らかになったことから、次に lincRNA がエピジェネティクスに関係しているかどうか検討するために、プロモーター活性への影響を評価した (図 10)。ルシフェラーゼアッセイ用の Region2 を含むコンストラクトは、lincRNA 転写領域も含むことから、内在性の lincRNA を発現する繊維芽細胞に Region2 のコンストラクトとともに lincRNA を阻害するアンチセンスオリゴ DNA を導入した。その結果、この lincRNA を阻害するアンチセンスオリゴ DNA の導入により、ルシフェラーゼ活性が低下したことから、lincRNA も *MSTN* の転写に関係することが明らかになった。以上の結果から、lincRNA の阻害により、エピジェネティクス変化を介してプロモーター活性に影響を与えることが示唆された。以上より、*MSTN*

はDNAメチル化と非コードRNAによる転写制御を受けることが明らかになった。今後、より詳細に lincRNA によるエピジェネティック制御の標的となる修飾を明らかにすることで、エピゲノム改変による遺伝子発現制御につながると考えられる。

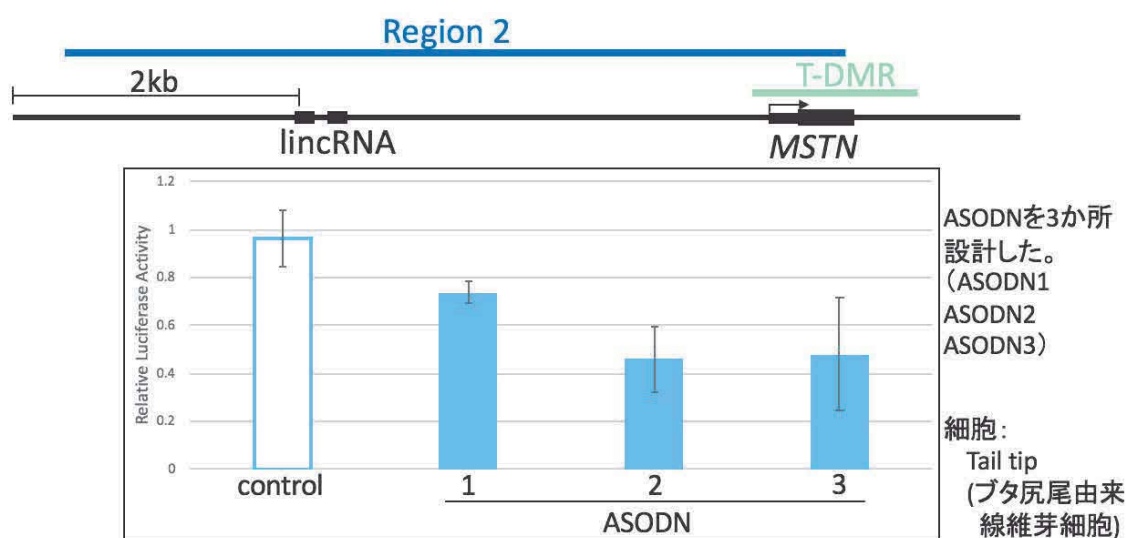


図 10 *MSTN* 遺伝子上流で lincRNA を発現する線維芽細胞で内在性 lincRNA をアンチセンスオリゴ DNA により阻害したときのプロモーター活性への影響

上のパネルはゲノム上での *MSTN* 遺伝子領域のゲノム構造を示す。プロモーター活性を測定した Region2 は、*MSTN* 上流のプロモーター領域内に *MSTN* 遺伝子とは逆方向に転写され、発現パターンも逆相関していることが確認された lincRNA を含む。下のパネルは Region2 をつないだ CpG フリールシフェラーゼベクターと内在性 lincRNA を阻害するアンチセンスオリゴ DNA (ASODN1、2 または 3) をブタ尾部線維芽細胞に共導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した結果を示す。グラフの縦軸は、Region2 を含むルシフェラーゼベクターのみを導入したときのシフェラーゼ活性を 1 とした相対値で示した。アンチセンスオリゴ DNA の導入によりプロモーター活性の低下が見られたことから、内在性 lincRNA はプロモーター活性の亢進に働く、または導入したアンチセンスオリゴ DNA にプロモーター活性の阻害効果があることが示唆された。