

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金  
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

## I. 基本情報

事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）  
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research  
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）メチローム解析の高度化と支援  
（英語）Improvements and Support in Methylome Analysis

補助事業担当者（日本語）九州大学大学院医学研究院 教授 伊藤隆司  
所属 役職 氏名：（英語）Takashi Ito, Professor, Graduate School of Medical Sciences,  
Kyushu University

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

一塩基解像度のメチローム解析のゴールドスタンダードは全ゲノムバイサルファイトシーケンシング (WGBS) である。Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) は WGBS を高感度で行うために我々が開発した独自技術であり、一細胞解析にも応用されている。

本研究では、PBAT を基盤とするメチローム解析技術に関して、以下の高度化研究を行った。

(1) 高感度ターゲットメチローム解析：WGBS はメチローム解析の理想形であるが、コストが高いため現実的には多検体解析には向かないという問題点があった。この問題に対応すべく、ハイブリダイゼーションを用いた標的ゲノム領域の濃縮による Targeted Genome Bisulfite Sequencing (TGBS) が開発されたが、マイクログラム量の投入 DNA と 10 サイクルを越える PCR 増幅を必要とするなど、感度の面で問題を抱えていた。そこで Agilent 社のキャプチャプローブで濃縮された微量のゲノム DNA に対して PBAT を行う独自 TGBS 手法の開発に取り組んだ。その結果、従来法と同等のマイクログラム量のゲノム DNA からであれば PCR なしで、従来法の 1/100 量からでも数回程度の PCR で、精度高く TGBS を実現する方法の確立に成功した。これにより、費用対効果の高い微量試料の多検体解析が実現し、臨床検体等への応用も可能になった。

(2) ライゲーションによる PBAT : PBAT には、低 GC 含量領域のカバレッジ低下と極微量解析におけるマッピング率の低下という弱点がある。これらの原因はいずれもアダプタ付加に利用するランダムプライミングにある。PBAT の弱点を克服するために、ランダムプライミングに代わるアダプタ付加法として、バイサルファイト処理 DNA のような一本鎖 DNA にアダプタとして一本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチド (ODN) を連結させる新しい方法の開発を試みた。その結果、1 本鎖 DNA (ssDNA) の 3' 末端にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) を用いて 3'-azide-ddNTP を 1 残基のみ取り込ませ、5'-エチニル化 ODN とクリック・ケミストリーで連結する方法を考案し、その原理検証に成功した。更に、ssDNA の 3'末端に TdT を用いてリボヌクレオチド (rAMP) を 2~4 残基のみ取り込ませた上で、RNA リガーゼを用いて 5'-リン酸化 ODN と効率的に連結させる方法の着想も得た。この方法は、RNA リガーゼの 5'-リン酸化 ssDNA に対する活性が 3'-OH が RNA から提供されていれば格段に向上する事実に基づく。各段階の条件を最適化した後、バイサルファイト処理 DNA に対してこの方法を適用したところ、現行 PBAT 法と比較して GC 含量によるカバレッジバイアスが改善することが確認された。この方法は次世代 PBAT の基盤技術としてのみならず、様々な応用の可能性があると期待される。

(3) 変化点検出によるメチロームの分節化：ゲノム中の CpG メチル化は、部位ごとに独立に制御されるのではなく、むしろ近接部位とともに領域として制御される。つまり、メチロームは同等のメチル化レベルを共有する CpG 部位が連続するドメインに分節化されている。そこで WGBS データに変化点検出アルゴリズムを適用して、メチル化レベルによってメチロームをドメインに分割する方法を開発した。更に、その結果を分かり易く視覚化する Methylated Domain Landscape プロットを考案し、メチローム分節化の傾向の直観的把握を実現した。

一方、支援活動に関しては、現行 PBAT による高感度 WGBS と高度化研究の成果である高感度 TGBS を提供した。更にパイプラインを構築して、WGBS/TGBS リードのマッピングのみならず、基本統計解析、ブラウザ表示、メチル化変動領域の検出等の一連の解析を提供できる体制を構築した。これらを駆使して合計 31 件のメチローム解析プロジェクトを成功裡に支援した。

The gold standard of single base-resolution methylome analysis is whole-genome bisulfite sequencing (WGBS). Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) is the method that we developed for highly sensitive WGBS and has been applied even to single-cell analysis.

This study conducted following developments to enhance PBAT-based methylome analysis.

(1) Highly-sensitive targeted methylome analysis: WGBS is an ideal method for methylome analysis, but its substantial cost makes it impractical for multi-sample comparison. To overcome this issue, methods have been developed for targeted genome bisulfite sequencing (TGBS) based on hybridization-based enrichment of targeted genomic regions. They are, however, problematic in terms of their sensitivity, requiring  $\mu\text{g}$ -quantity of input DNA and >10 cycles of PCR. We thus intended to develop a highly sensitive method by applying PBAT to the DNA enriched using the Agilent capture probes. Consequently, we succeeded in establishing a novel method that requires no and only a few cycles of PCR to ensure highly accurate TGBS starting from microgram quantity and

its 1/100th of input DNA, respectively. This method has realized cost-effective methylome analysis from multiple samples with limited quantities, enabling a wide application to clinical specimen.

(2) Ligation-mediated PBAT: Current PBAT has two drawbacks, or compromised coverage of low-GC regions and compromised mapping rate in ultra-low input analysis, both of which are attributable to random priming reaction used for adaptor tagging. To substitute for random priming, we intended to develop a novel method for ligation between single-stranded DNA (ssDNA) such as bisulfite-treated one and an adaptor oligodeoxyribonucleotide (ODN). We conceived a method that uses terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) to incorporate 3'-azide-ddNTP to the 3'-end of ssDNA for ligation with 5'-ethynyl-ODN via click chemistry, and succeeded in proving its principle. We also conceived another method that exploits TdT to incorporate a few residues of ribonucleotide (rAMP) at the 3'-end of ssDNA for efficient ligation with 5'-phospho-ODN by RNA ligase. This method is based on the fact that the activity of RNA ligase toward 5'-phospho-ssDNA is drastically enhanced when 3'-OH is provided by RNA but not DNA. Following the optimization of each step, we applied the method to bisulfite-treated DNA to mitigate GC-biased coverage compared to current PBAT. We expect that this method is useful not only for the next-generation PBAT but many other applications.

(3) Methylome segmentation by change point detection: CpG methylation is controlled not at each site but coordinately with its neighbors, leading to form a domain wherein all CpG sites share a similar methylation level. We developed a novel method that applies a change point detection algorithm to WGBS data to identify the boundaries between such domains. We also proposed a methylated domain landscape plot that enables one to intuitively grasp the trends in segmentation of each methylome.

For the research support activity, we provided both WGBS with current PBAT and the newly developed highly sensitive TGBS described above. We also established a pipeline for not only mapping of WGBS/TGBS reads but also a series of data analysis, including basic statistics, data visualization in genome browser, identification of differentially methylated regions and so forth. We exploited these technologies to successfully support 31 methylome projects.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 6 件、国際誌 5 件)

1. 三浦史仁, 伊藤隆司, バイサルファイト変換で全ゲノム DNA メチル化を定量する, 実験医学別冊 次世代シーケンス解析スタンダード, 2014, p.143-155
2. 三浦史仁, 伊藤隆司, 次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化解析, エピジェネティクスの産業応用, 2014, p.129-140
3. MIURA F, ITO T. Highly sensitive targeted methylome sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. DNA Res. 2015, 22, 13-18.
4. COLICCHIO JM, MIURA F, KELLY JK, ITO T, HILEMAN LC. DNA methylation and gene expression in *Mimulus guttatus*. BMC Genomics 2015, 16, 507.

5. YOKOYAMA T, MIURA F, ARAKI H, OKAMURA K, ITO T. Changepoint detection in base-resolution methylome data reveals a robust signature of methylated domain landscape. *BMC Genomics* 2015, 16, 594.
6. 三浦史仁, 伊藤隆司, 1細胞メチローム解析, *細胞工学* 2015, 34, 258-263
7. KOIKE T, WAKAI T, JINCHO Y, SAKASHITA A, KOBAYASHI H, MIZUTANI E, WAKAYAMA S, MIURA F, ITO T, KONO T. DNA methylation errors in cloned mouse sperm by germ line barrier evasion. *Biol. Reprod.* 2016, 94, 128.
8. 三浦史仁, 伊藤隆司, 一細胞エピゲノム解析, *医学のあゆみ* 2016, 258, 281-286
9. 三浦史仁, 伊藤隆司, エピゲノム解析手技の標準化: 全ゲノムバイサルファイトシーケンシング, *実験医学増刊号 エピゲノム研究 修飾の全体像の理解から先制・個別化医療へ*, 2016, p.25-31
10. 荒木啓充, 伊藤隆司, エピゲノムのビッグデータ解析, *実験医学増刊ビッグデータ 変革する生命科学・医療*, 2016, p.58-64
11. TOH H, SHIRANE K, MIURA F, KUBO N, ICHIYANAGI K, HAYASHI K, SAITOU M, SUYAMA M, ITO T, SASAKI H. Software updates in the Illumina HiSeq platform affect whole-genome bisulfite sequencing. *BMC Genomics* 2017, 18, 31.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. PBAT による高感度な一塩基解像度メチローム解析, 口頭, 伊藤隆司, イルミナ次世代シーケンサフォーラム 2014, 2014/7/16, 国内.
2. Highly Sensitive Methylome Sequencing by Post-Bisulfite Adaptor Tagging: Whole-Genome and Targeted Approaches, oral, Ito T, IHEC2014 Science Day, 2014/10/8, 国外.
3. Sequencing the methylome with high sensitivity, oral, Ito T, International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, 2014/11/4, 国内.
4. PBAT によるショットガンバイサルファイトシーケンシングの高感度化とその応用, ポスター, 三浦史仁, 伊藤隆司, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014/11/27, 国内.
5. Sequencing the methylome with high sensitivity, oral, Ito T, Riken Epigenetics in Kobe 2015, 2015/2/14, 国内.
6. MDL プロットを用いた比較メチローム解析, 口頭, 三浦史仁, 横山貴央, 荒木啓充, 岡村浩司, 伊藤隆司, 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2015/5/25, 国内.
7. PBAT による高感度メチロームシーケンシング, 口頭, 伊藤隆司, 第 42 回日本毒性学会学術年会シンポジウム「in vitro と in vivo の接点から探るエピジェネティック毒性」, 2015/7/1, 国内.
8. 次世代シーケンシングによる高感度一塩基解像度メチローム解析, 口頭, 伊藤隆司, 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2015), 2015/8/22, 国内.
9. Segmenting the Methylome by Changepoint Detection in Whole-genome Bisulfite Sequencing Data, poster, Miura F, Inoue K, Yokoyama T, Araki H, Arai E, Yamashita S, Hama N, Suzuki Y, Shibata T, Kanai Y, Ito T, IHEC2015, 2015/11/16, 国内.

10. Base-resolution Methylome Analysis of the Retinal Pigment Epithelium Used in the First Case of Patient-derived Induced Pluripotent Stem Cell-based Autologous Transplantation, poster, Araki H, Miura F, Watanabe A, Morinaga C, Kitaoka F, Kitano Y, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Yamanaka S, Takahashi M, Ito T, IHEC2015, 2015/11/16, 国内.
11. タングステン酸化による5ヒドロキシメチルシトシン検出に有望なDNAポリメラーゼ, ポスター, 三浦史仁, 伊藤隆司, BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会), 2015/12/11, 国内.
12. エピゲノムシーケンシングの新技术, 口頭, 伊藤隆司, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「エピジェネティクス – 分子機構から高次機能まで –」, 2015/12/11, 国内.
13. エピゲノムを測る, 口頭, 伊藤隆司, CREST シンポジウム「トランスオミクスによる生命システムの解明」, 2016/3/3, 国内.
14. 新しい1本鎖DNAの連結反応を用いたPBAT法, ポスター, 三浦史仁, 伊藤隆司, 第10回日本エピジェネティクス研究会年会, 2016/5/19-20, 国内.
15. 「滲出型加齢黄斑変性に対する自家iPS細胞由来網膜色素上皮シート移植に関する臨床研究」における第一症例の網膜色素上皮シートの一塩基解像度メチローム解析, ポスター, 荒木啓充, 三浦史仁, 渡辺亮, 森永千佳子, 北岡文美代, 北野優子, 坂井徳子, 柴田由美子, 寺田基剛, 山中伸弥, 高橋政代, 伊藤隆司, 第10回日本エピジェネティクス研究会年会, 2016/5/19-20, 国内.
16. An efficient method for single-stranded DNA ligation – An alternative approach for shotgun bisulfite sequencing with PBAT, poster, Miura F, Ito T, IHEC 2016, 2016/9/7-9, 国外.
17. 自家iPS細胞由来網膜色素上皮シートの一塩基解像度メチル化解析, ポスター, 荒木啓充, 三浦史仁, 渡辺亮, 森永千佳子, 北岡文美代, 北野優子, 坂井徳子, 柴田由美子, 寺田基剛, 山中伸弥, 高橋政代, 伊藤隆司, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~12/2, 国内.
18. 新しい1本鎖DNAの連結反応を用いたPBAT法, ポスター, 三浦史仁, 伊藤隆司, 第39回日本分子生物学会年会, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~12/2, 国内.

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ゲノム科学と21世紀の生命科学, 伊藤隆司, 九州大学オープンキャンパス, 2015/8/3, 国内.
2. ゲノム科学と21世紀の生命科学, 伊藤隆司, 福岡県生物部会研修会, 2016/10/16, 国内.

### (4) 特許出願

1. 特願 2016-98101 号