

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14452

研究課題名(和文) 新技术を駆使した領域特異的なDNAメチル化の可塑性制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) A novel approach to the plasticity of region dependent regulation of DNA methylation

研究代表者

中島 欽一 (Nakashima, Kinichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80302892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：dCas9をGfap遺伝子プロモーターに結合させる数種のコンストラクトを成熟神経幹細胞に導入したところ、dCas9の結合が転写開始点に近づくほど遺伝子発現が低下することが明らかとなった。以上の結果から、enChIP法をエピジェネティクス修飾誘導因子の探索に用いる場合、転写開始点近傍に結合するタンパク質の探索には不向きであることがわかった。しかし、本研究課題の中で、enChIP法が非常に高い領域特異性をもっていることも得られたことから、標的とする領域がプロモーター領域外や転写開始点から離れた領域である場合においては、結合タンパク質群の探索に十分に有効であることが示唆できた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we tried to establish a new approach to obtain the candidate proteins that control the target specificity of epigenetic modification enzymes by utilizing CRISPR/dCas9-based enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation). We found that dCas9 can bind to the target promoter region with high-specificity and without affecting DNA methylation status. However, binding of dCas9 significantly decreased the target gene expression, especially when binding region of dCas9 is located adjacent to the transcription start site. Our findings suggest that CRISPR/dCas9-based enChIP has limited utility in the adaptable regions but could be applied as an approach in other genomic regions.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 エピジェネティクス DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

個体を形成する多様な細胞種は、分化・産生の過程でそれぞれ異なるDNAメチル化状態を獲得する。DNAメチル化は転写抑制作用を有しており、各遺伝子プロモーター領域に細胞種特有のメチル化状態が形成されることで、独自の遺伝子発現パターンが形成される。DNAメチル化状態が遺伝子ごとに制御されることを考えると、DNAメチル化状態を領域特異的に変化させるメカニズムが必要であると考えられるが、その分子メカニズムには未だ不明な点が多い。

これまでにDNAメチル化修飾を制御する因子としてDNAメチル化酵素群 (DNMTs) やDNA脱メチル化関連酵素群 (TETs) が同定されているが、これらの因子自身は作用する領域に特異性を持たない。従って、これらを領域特異的に作用させる (もしくは阻害する) 因子が他に必要であると考えられる。申請者はこれまでに、神経幹細胞のアストロサイトへの分化制御機構解明に向けた研究の中で、アストロサイト特異的遺伝子Gfapのプロモーター領域特異的にDNA脱メチル化を誘導する転写因子を同定した (Dev cell 2001, 2009) が、領域特異的メチル化制御の全体像を知るためには単一因子の解析では不十分である。しかし、数多く存在するDNA結合因子の中から領域特異性を制御する因子を同定するのは非常に困難であり、このような因子を効率的に同定するためには、候補因子を網羅的に選出する方法の確立が必要であると考えた。そこで、近年開発された標的領域に結合している因子を網羅的に同定する手法 (Fujita T et al, BBRC, 2013) を応用し、エピジェネティクス修飾が変化する領域に結合しているタンパク質を特定することで、エピジェネティクス修飾因子を領域特異的に作用させている因子を探索する本解析方法の考案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR-Cas法を用いて標的ゲノム領域に結合しているタンパク質群をクロマチン免疫沈降 (ChIP) により採取する方法 (enChIP) を応用し、DNAメチル化状態の変化を誘導する因子を探索する新たな解析方法の確立を目指した。しかしながら、enChIP法は開発されて間もない技術であり、従ってこれまでに利用された報告も極めて少ない。そこで本研究課題では、enChIP法をエピジェネティクス研究分野に応用するに際し必要となる種々の条件検討を行い、enChIP法がエピジェネティクス修飾誘導因

子の探索に有効な手法となりえるかを検討するとともに、それらの最適条件の選定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1. 公共のデータベースを用いて、胚性幹細胞がニューロンへの分化能のみを保持した原始神経幹細胞へ、そしてその後グリア細胞への分化能も獲得した成熟神経幹細胞へと分化していく際にプロモーター領域にDNAメチル化の変動が誘導される遺伝子群を特定し、それらのプロモーター領域にdCas9を結合させるためのコンストラクトを作成した。enChIP法の有効性を検討するために、2. dCas9が十分な領域特異性を有していることを調べ、その後、標的領域に結合することにより標的領域のDNAメチル化状態や、標的遺伝子の遺伝子発現に変動が生じるかについて検討を行った。また、3. プロモーター領域内でdCas9が結合する領域を変化させることにより、dCas9の結合によるDNAメチル化や遺伝子発現への影響が最も低くなる最適条件を検討した。

4. 研究成果

胚性幹細胞が始原神経幹細胞へと分化していく際にDNAメチル化が誘導される遺伝子としてNanog, Oct4を同定し、始原神経幹細胞が成熟神経幹細胞へと変化していく際にDNAの脱メチル化が誘導される遺伝子としてGfap, S100bを同定した。次に、enChIPの有効性を調べるために、これらの遺伝子うちGfapに絞りdCas9をプロモーター領域へと結合させるコンストラクトを作成し、原始神経幹細胞へと導入後、DNAメチル化への影響を検討した。その結果、dCas9の結合によるDNAメチル化状態への影響は観察されなかった。Gfapの発現は原始神経幹細胞においては非常に低く、成熟神経幹細胞へと変化した際に開始される。dCas9の結合による遺伝子発現への影響を検討するために、dCas9をGfapプロモーターに結合させるコンストラクトを成熟神経幹細胞に導入し、遺伝子発現への影響を調べた結果、dCas9の結合により遺伝子発現が著しく低下することが明らかとなった。そこで次に、dCas9が結合するプロモーター領域内の位置を変え、dCas9の結合による遺伝子発現への影響が最小となる条件の探索を行った。その結果、dCas9の結合が転写開始点に近づくほど遺伝子発現が低下することが明らかとなった。以上の結果から、enChIP法をエピジェネティクス修飾誘導因

子の探索に用いる場合、転写開始点近傍に結合するタンパク質の探索には不向きであることがわかった。しかしながら、本研究課題の中で、enChIP法が非常に高い領域特異性をもっていることも得られたことから、標的とする領域がプロモーター領域外や転写開始点から離れた領域である場合においては、結合タンパク質群の探索に十分に有効であることが示唆できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

1. Noguchi H., Murao N., Kimura A., Matsuda T., Namihira M. & Nakashima K. DNA Methyltransferase 1 Is Indispensable for Development of the Hippocampal Dentate Gyrus. *J Neurosci* 36, 6050-6068 (2016).
2. Noguchi H., Kimura A., Murao N., Namihira M. & Nakashima K. Prenatal deletion of DNA methyltransferase 1 in neural stem cells impairs neurogenesis and causes anxiety-like behavior in adulthood. *Neurogenesis (Austin)* 3, e1232679 (2016).
3. Murao N., Noguchi H. & Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell property from embryo to adult. *Neuroepigenetics* (2016).
4. Morita S., Noguchi H., Horii T., Nakabayashi K., Kimura M., Okamura K., Sakai A., Nakashima H., Hata K., Nakashima K. & Hatada I. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol* (2016).
5. Noguchi H., Kimura A., Murao N., Matsuda T., Namihira M. & Nakashima K. Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res* 95, 1-11 (2015).

[学会発表](計 32件)

<国内>

1. 中島欽一: MeCP2の新規作用によるレット病態関連細胞制御、レット症候群国際シンポジウム、兵庫県、神戸国際会議場、2017年3月18-3月19日(19日)(シンポジウム)

2. 中島欽一: 低酸素培養によるヒトiPS由来神経幹細胞のアストロサイト分化脳制御、第90回日本薬理学会年会、長崎県、長崎ブリックホール、2017年3月15-3月17日(17日)(シンポジウム)
3. 中島欽一: MeCP2のmiRNAプロセシング作用を介したレット病態関連細胞制御、第26回神経行動薬理若手研究者の集い、福岡県、福大メディカルホール、2017年3月14日(シンポジウム)
4. 松田泰斗、中島欽一: Transcriptional and epigenetic dynamics during direct conversion of microglia into functional neurons、第10回神経発生討論会、宮城県、秋保リゾートホテルクレセント、2017年3月10-11日
5. 竹生田 淳、松田泰斗、佐野坂司、堅田明子、中島欽一: Transcription factor NFI-mediated DNA methylation regulatory network controlling neuron-glia fate switching of neural stem cells、第10回神経発生討論会、宮城県、秋保リゾートホテルクレセント、2017年3月10-11日(ポスター)
6. 松田泰斗、中島欽一: エピゲノム変換を介した遺伝子発現オン・オフ制御に基づく異種細胞間直接分化転換機構の解明、第12回成体脳のニューロン新生懇談会、滋賀県、滋賀医科大学、2017年2月18日
7. 中島欽一: HDAC阻害剤胎生期暴露による学習記憶障害とその改善法、第35回日本認知症学会学術集会、東京都、東京国際フォーラム、2016年12月1-12月3日(2日)(シンポジウム)
8. 森田純代、野口浩史、堀居拓郎、中林一彦、木村美香、岡村浩司、坂井 淳彦、中嶋 秀行、秦健一郎、中島欽一、畑田出穂: ゲノム編集を利用したエピゲノムの書き換え、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(2日)(シンポジウム)

9. 安井徹郎、上蘭直弘、中嶋秀行、松田泰斗、中島欽一: 低酸素培養によるヒトiPS由来神経幹細胞の短期アストロサイト分化誘導、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(1日)(ポスター)
10. 中島欽一: 神経幹細胞のエピジェネティック制御と脊髄損傷治療への応用、第39回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年11月30-12月2日(30日)(シンポジウム)
11. 森田純代、野口浩史、堀居拓郎、中林一彦、木村美香、岡村浩司、坂井淳彦、中嶋秀行、秦健一郎、中島欽一、畑田出穂: CRISPR/Casを用いたエピゲノム編集法、日本核酸医薬学会 第2回年会、東京都、東京理科大学葛飾キャンパス、2016年11月15日-11月17日(15日)(シンポジウム)
12. 中島欽一: 神経系細胞のエピジェネティクス、第46回新潟神経学夏期セミナー、新潟県、新潟大学脳研究所、2016年7月28-7月30日(30日)(招待講演)
13. 中島欽一: Mechanism of Rett syndrome pathogenesis、第39回日本神経科学大会、横浜市、パシフィコ横浜、2016年7月20-22日(20日)(シンポジウム)
14. 中島欽一: レット症候群原因因子MeCP2のmiRNA合成を介したニューロン機能制御、第43回日本毒性学会学術年会、愛知県、ウインクあいち、2016年6月29-7月1日(30日)(シンポジウム)
15. 中島欽一: 神経系におけるエピジェネティクス、第10回日本エピジェネティクス研究会、大阪府、千里ライフサイエンスセンター、2016年5月19-20日(20日)
16. 中島欽一: 神経幹細胞分化とニューロン機能を制御するエピジェネティクス機構、第1回名古屋市大頭脳循環セミナー、名古屋市、名古屋市立大学、2016年4月8日
17. 中島欽一: 移植神経幹細胞のエピジェネティック制御と脊髄損傷治療への応用、第15回日本再生医療学会総会、大阪府、大阪国際会議場、2016年3月17日-19日(17日)(シンポジウム)
18. 中島欽一: Reduced adult hippocampal neurogenesis and cognitive impairments following prenatal administration of the antiepileptic drug, valproic acid、第3回国際シンポジウム、東京都、東京大学小柴ホール、2016年2月11日-12日(11日)
19. 中島欽一: miR-199aはMeCP2とmTORシグナルをリンクしレット症候群発症に関与する、大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪府、大阪大学蛋白質研究所、2015年12月11日-12日(11日)
20. 河村陽一郎、野口浩史、堅田明子、中島欽一: 胎生期マウス終脳におけるアストロサイト分化誘導因子産生細胞の同定、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(2日)(ポスター)
21. 安井徹郎、上蘭直弘、野口浩史、村尾直哉、松田泰斗、中島欽一: ヒト神経幹細胞の発生進行に伴った性質変化には低酸素条件が重要である、第38回日本分子生物学会年会、兵庫県、神戸ポートアイランド、2015年12月1日-4日(1日)(口頭)(ポスター)
22. 中島欽一: 神経幹細胞のエピジェネティック制御とその作用、第6回神経科学と構造生物学の融合研究会、愛知県、岡崎コンファレンスセンター、2015年11月26日-27日(26日)
23. 村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一: 成体海馬ニューロン新生におけるヘミメチル化DNA認識因子Np95/Uhrf1の役割、第11回成体脳のニューロン新生懇談会、愛知県、名古屋市立大学、2015年11月14日(ポスター)
24. 中島欽一: The microRNA, linking MeCP2 with mTOR signaling and its dysregulation

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

- cause Rett syndrome phenotypes、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレ-セガト-キングダムサッポロ、2015年9月15日-18日(17日)(招待)
25. 村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一: Epigenetic regulator Np95/Uhrfl regulates multiple stages of adult hippocampal neurogenesis、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレ-セガト-キングダムサッポロ、2015年9月15日-18日(17日)(ポスター)
26. 野口浩史、波平昌一、佐野坂司、辻村啓太、深尾陽一朗、五十嵐勝秀、木村文香、中嶋秀行、中島欽一: Maintenance DNA methyltransferase DNMT1 contributes to the fate regulation of neural stem cells through DNA methylation-dependent and-independent manners during cortical development、第40回内藤コンファレンス、北海道、シャトレ-セガト-キングダムサッポロ、2015年9月15日-18日(16日)(ポスター)
27. 中島欽一: エピジェネティックな神経幹細胞制御、第16回運動器科学研究会、鹿児島県、みなみホール、2015年9月11日-12日(11日)(招待、セミナー)
28. 村尾直哉、松田泰斗、野口浩史、古関明彦、波平昌一、中島欽一: 成体海馬ニューロン新生におけるヘミメチル化DNA認識因子 Np95/Uhrfl1の役割、第38回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015年7月28日-31日(29日)(口頭)
29. 中島欽一: 胎生期HDAC阻害剤曝露による遅発性学習記憶障害とその発症機序、第42回日本毒性学会学術年会、ホテル日航金沢、2015年6月29日-7月1日(7月1日)(シンポジウム)

<国際>

1. Nakashima, K.: Insights into Rett Syndrome using Neural Stem Cells, KEYSTONE SYMPOSIA, Olympic

- Valley, January 8-12, 2017
2. Nakashima, K.: Neural Stem Cell Regulation and Its Therapeutic Application to Spinal Cord Injury, Gordon Research Conference (Molecular & Cellular Neurobiology)(Hong Kong, China) June 12-17, 2016
3. Kimura, A., Noguchi, H., Otsuka, M., Igarashi, K., Imamura, T., Namihira, M., Nakashima, K.: Analysis of the mechanism underlying anxiety-like behavior observed in neuron-specific Dnmt1 knock-out mice. Society for Neuroscience 2015, McCormic Place in Chicago, October 17-21, 2015

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 欽一 (NAKASHIMA, Kinichi)
九州大学大学院・医学研究院・教授
研究者番号：80302892