

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14924

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を応用した特定ゲノム部位に対するDNAメチル化導入手法の確立

研究課題名(英文) Establishment of method inducing DNA methylation by epigenome editing.

研究代表者

山崎 大賀 (YAMAZAKI, Taiga)

北里大学・北里大学メディカルセンター・上級研究員

研究者番号：90524231

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)：DNAメチル化は転写制御を通じて個体発生や疾患の発症などに重要な役割を果たしており、DNAメチル化の人為的制御は基礎研究・応用研究において重要な技術基盤となる。本研究はゲノム編集技術を応用した配列特異的DNAメチル化の導入技術を開発するものであり、マウスのペリセントロメアを標的としたDNAメチル化導入について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation plays crucial roles in regulating gene expression, and aberrant DNA methylation leads developmental defects and diseases. Artificial control of DNA methylation in specific loci would be the valuable tool for both basic and applied research. In this research, we develop the method of epigenome editing especially in 'Writing DNA methylation' in mouse pericentromeres and centromeres.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DNAメチル化 エピゲノム編集 ペリセントロメア

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化は転写制御を通じて個体発生や細胞の恒常性維持に重要な役割を果たすことが知られている。正常な DNA メチル化パターンの喪失は発生不良や疾患の発症を引き起こす。DNA メチル化の書き込みについては、哺乳動物では Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の 3 種類の DNA メチル化酵素が知られており、いずれの欠損動物も出生前あるいは出生後に死亡する (Li et al., *Cell.*, 1992, Okano et al., *Cell.*, 1999)。DNA メチル化の消去を担う分子については長い間不明であったが、2010 年に酸化反応を介してメチルシトシンのシトシンへの変換に寄与する Tet タンパク群が見出された (Ito et al., *Nature.*, 2010)。DNA メチル化の書き込みと消去に関わる役者が揃ったことにより、DNA メチル化のダイナミクスと生命現象に脚光が集まることとなった。一般に分子機能の解析には過剰発現やノックアウトなどの研究手法が用いられるが、DNA メチル化に関わるこれら分子はゲノムの広範囲にわたって機能をしている。そのため、特定のゲノム部位における DNA メチル化機能を解析するには、ゲノム部位特異的に DNA メチル化を書き換える技術が必要となる。

近年爆発的に普及しているゲノム編集技術は任意の DNA 配列を認識して結合する DNA 認識モジュールを利用したものであり、DNA 認識モジュールのデザインの柔軟性が広く普及する技術となった要因である。また、DNA 切断だけでなく、蛍光タンパク質を組み合わせることによる特定ゲノムの可視化や、転写活性因子・抑制因子との組み合わせによる転写調節などの応用研究が報告されている。同様にエピゲノムの書き込み・消去に関わる分子を用いることによって、エピゲノム編集が可能になると考えられる。本研究の開始当初はエピゲノム編集に関する報告は少なく、確立した技術開発が求められていた。

2. 研究の目的

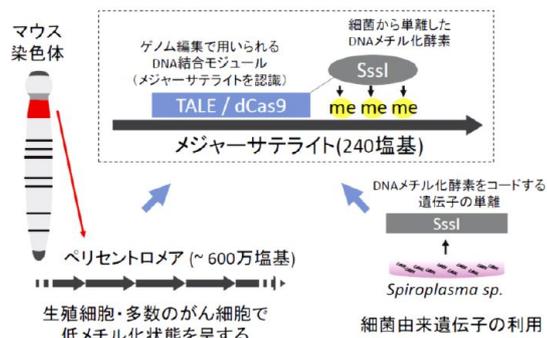
本研究はゲノム編集技術を応用して DNA メチル化を「書き込む」技術の開発を行うことを目的とした。従来手法では Zinc Finger タンパク質や特定のゲノム配列を認識する DNA 結合ドメインを DNA メチル化酵素と融合させた人工酵素による検討が成されてきたが、Zinc Finger の作製は煩雑であることから広く普及するには至っていない。そこで本研究では近年ゲノム編集で広く使用されている TALE および CRISPR/Cas9 を応用し、DNA メチル化導入方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

マウスペリセントロメアを対象に、DNA メチル化の導入について検討を行った (図 1)。TALE を使用する場合にはペリセントロメアを構成するリピート配列であるメジャーサ

テライトを認識する TALE (TALMaj) と細菌から単離した CpG メチル化酵素である SssI との融合遺伝子 TALMaj-SssI を作製し、これを実験に用いた。CRISPR/Cas9 を用いる場合には DNA 切断活性を欠失した変異体である dCas9 を用い、これと SssI との融合タンパク質 dCas9-SssI を、メジャーサテライトを認識するガイド RNA (gRNA) と一緒に発現させ、DNA メチル化導入が行われるかどうかを検討した。アッセイにはペリセントロメアが低メチル化を示すマウス受精卵またはマウスの DNA メチル化酵素 3 種類 (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b) を全て欠損した ES 細胞 (Dnmt TKO ES 細胞) を用いた。

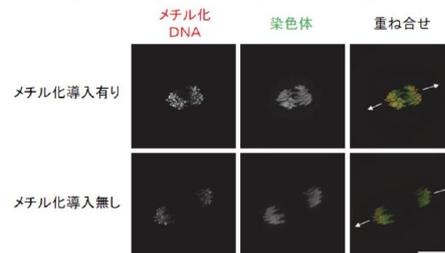
図 1 本研究におけるエピゲノム編集の概要



4. 研究成果

DNA メチル化導入について検討するため、TALMaj-SssI をコードする mRNA を *in vitro* 合成し、マウス受精卵に顕微注射した。同時に、DNA メチル化をモニターするための蛍光プローブとして mCherry-MBD-NLS を、クロマチンをモニターするための蛍光プローブとしてヒストン H2B-EGFP を使用し、胚発生過程における DNA メチル化状態とクロマチンをライブセルイメージングで観察した。その結果、TALMaj-SssI を導入した卵子において、分裂期染色体の染色体末端部分において顕著な DNA メチル化シグナルの亢進が認められた (図 2)。DNA メチル化酵素活性を欠失させた変異体では DNA メチル化シグナルの亢進は認められなかった。

図 2 受精卵の分裂後期の染色体におけるペリセントロメアへの DNA メチル化導入



受精卵における分裂後期の染色体のスナップショット。「メチル化導入有り」の受精卵において分配方向の染色体末端近くに DNA メチル化の亢進が認められる。「メチル化導入無し」の染色体においても末端部分にメチル化 DNA のシグナルが認められるが、これは元々細胞が持っている DNA メチル化状態を示している。

赤：メチル化 DNA 緑：染色体 矢印：染色体分配方向 スケールバー：20 μm

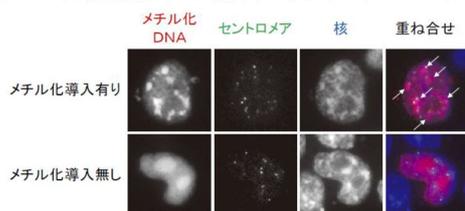
亢進した DNA メチル化は M 期染色体だけでなく間期核におけるヘテロクロマチン領域

においても観察された。バイサルファイトシークエンスによって導入された DNA メチル化を確認したところ、メジャーサテライトに効率的に DNA メチル化が導入されていることを確認した。ペリセントロメアに DNA メチル化を導入したマウス受精卵の細胞分裂過程における染色体分配異常を調べたところ、DNA メチル化導入した受精卵と DNA メチル化導入していない受精卵とで大きな違いは認められず、着床前初期胚発生の細胞分裂機能にペリセントロメアの DNA メチル化は重要ではないことが示された。

同様の実験系を用い、dCas9-SssI とメジャーサテライト認識 gRNA をマウス受精卵に導入したところ、mCherry-MBD-NLS のヘテロクロマチン領域への集積を認め、バイサルファイトシークエンスの結果からもメジャーサテライトへの DNA メチル化導入を確認することができた。

次に Dnmt TKO ES 細胞に TALMaj-SssI を発現させた (図 3)。Dnmt TKO ES 細胞内での mCherry-MBD-NLS の局在パターンは均一な核内分散パターンであり、一部が核小体へと集積する傾向がある。しかし、ペリセントロメアに対する DNA メチル化を亢進させた結果、ペリセントロメアが集積していると思われるヘテロクロマチン領域にシグナルが集積する結果となった。

図 3 DNA メチル化酵素欠損マウス ES 細胞内でのペリセントロメアへの DNA メチル化導入



「メチル化導入有り」の細胞では、核内のセントロメア近傍においてメチル化 DNA のシグナルの亢進が認められる (矢印)。一方で、「メチル化導入無し」の細胞ではメチル化 DNA のシグナルは核内でほぼ均一のシグナルとなる (核小体にシグナルが集積する)。

赤：メチル化 DND 緑：セントロメア 青：核 スケールバー：20 μm

従来のエピゲノム編集で使用されてきた哺乳動物由来の DNA メチル化酵素は協調してはたらく分子を必要とするが、本研究で作製した細菌由来 DNA メチル化酵素はそれ単体で機能することから、他の生体作用の影響を受けずに安定した DNA メチル化導入効果を発揮することが期待される。また、哺乳動物以外の生物種においても DNA メチル化導入効果が期待されることから、汎用性の高い技術を開発することができた。

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 3 件)

- (1) Expression of KK-LC-1, a cancer/testis antigen, at non-tumour sites of the stomach

carrying a tumour. Fukuyama T, Futawatari N, Yamamura R, Yamazaki T, Ichiki Y, Ema A, Ushiku H, Nishi Y, Takahashi Y, Otsuka T, Yamazaki H, Koizumi W, Yasumoto K, Kobayashi N. Sci Rep. 2018 Apr

17;8(1):6131. doi:

10.1038/s41598-018-24514-9.

- (2) Targeted DNA methylation in pericentromeres with genome editing-based artificial DNA methyltransferase. Yamazaki T, Hatano Y, Handa T, Kato S, Hoida K, Yamamura R, Fukuyama T, Uematsu T, Kobayashi N, Kimura H, Yamagata K. PLoS One. 2017 May 18;12(5):e0177764. doi: 10.1371/journal.pone.0177764. eCollection 2017.
- (3) Correlation Between Expression of the Cancer/Testis Antigen KK-LC-1 and *Helicobacter pylori* Infection in Gastric Cancer. Fukuyama T, Futawatari N, Ichiki Y, Shida A, Yamazaki T, Nishi Y, Nonoguchi H, Takahashi Y, Yamazaki H, Kobayashi N. In Vivo. 2017 May-Jun;31(3):403-407.

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 山崎大賀 生殖細胞の DNA メチル化ダイナミクスの理解に向けて～マウス受精卵へのエピゲノム編集技術の応用～、第 16 回教育推進センター講演会、平成 29 年 9 月、旭川医科大学、北海道旭川市
- (2) 山崎大賀、波多野 裕、半田哲也、加藤佐樹子、穂井田謙介、山村瑠衣、福山 隆、植松崇之、小林憲忠、木村 宏、山縣一夫：ゲノム編集技術を応用したペリセントロメアへの人為的・配列特異的 DNA メチル化誘導、第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会、2017 年 5 月、東京一ツ橋学術総合センター、東京都千代田区
- (3) 山崎大賀：細菌由来 CpG メチル化酵素を用いたエピゲノム編集技術の開発、第 1 回日本遺伝子細胞治療学会若手研究会セミナー2016 年 12 月、東京慈恵医科大学、東京都港区
- (4) 山崎大賀、山縣一夫、小林憲忠：ゲノ

ム編集技術を応用したペリセントロメアへの人為的・配列特異的 DNA メチル化誘導,第 1 回日本ゲノム編集学会、2016 年 9 月、広島国際会議場、広島県広島、

(5) Taiga Yamazaki, Kazuo Yamagata, Noritada Kobayashi. Targeted DNA methylation in pericentromere with genome editing based artificial DNA methyltransferase. International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells. (2016 年 2 月)

(6) 山崎大賀、山縣一夫、小林憲忠：ゲノム編集技術を応用したペリセントロメアへの人為的・配列特異的 DNA メチル化誘導,第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
該当ありません。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎大賀 (YAMAZAKI Taiga)

北里大学・北里大学メディカルセンター・研究部門・上級研究員

研究者番号：90524231

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし