

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18458

研究課題名(和文)ゲノムインプリンティング制御機構の包括的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of genome imprinting regulation

研究代表者

関田 洋一 (SEKITA, YOICHI)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：20431950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック制御は、発生や疾病など、さまざまな生命現象に関わる重要な遺伝子発現制御機構で、近年大きな注目を集めている。ゲノムインプリンティングは、典型的なエピジェネティック制御機構である。本研究では、CRISPR/Cas9システムを応用したenChIP法と受精卵の核移植によって作出された特殊な培養細胞を組み合わせることによって、インプリンティング制御に関わるタンパク質因子の探索を行った。これにより、DNAメチル化状態依存的にインプリンティング制御領域に結合するタンパク質因子を同定した。また、その一つがDNAメチル化制御に関わっている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic gene regulation has critical roles for various physiological phenomena including development and diseases. Genomic imprinting is a typical epigenetic mechanism by which imprinted genes are expressed in a parent-of-origin specific manner. In this study, I searched for protein factors involved in imprinting regulation by combining enChIP, a new strategy developed from the CRISPR/Cas9 system, and special cell lines produced by nuclear transfer technology of fertilized egg. A lenti virus vector that expresses PA-tagged dCas9 for enChIP experiments was constructed and has been deposited to RIKEN BRC and Addgene. By using this construct, I identified proteins that bind to imprinting control regions in a DNA methylation dependent manner. It is suggested that one of these factors is possibly involved in a DNA methylation control mechanism.

研究分野：エピジェネティクス、幹細胞学

キーワード：エピジェネティクス ゲノムインプリンティング enChIP CRISPR/Cas9 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

人間の体を構成する約 200 種類の細胞は、免疫系の細胞を除いて、ほぼ同じゲノム情報を有している。同じゲノム情報を持ちながら、機能や性質、見た目などが異なる細胞種が生じるのは、それぞれの細胞種が使っているゲノム情報、すなわち発現させている遺伝子の組み合わせが異なることによる。このような遺伝子発現を調節する中心的な機構として、エピジェネティック制御機構がある。これは、DNA の一次配列を変えることなく、DNA やヒストンの化学修飾などによって、遺伝子発現を制御する機構である。エピジェネティック制御は、発生や分化に重要であるばかりか、最近ではガンや糖尿病、神経変性疾患などの疾病においても重要な役割を担っていることが明らかにされている。

ゲノムインプリンティングは、典型的なエピジェネティック制御機構の一つである。ゲノムインプリンティングの制御を受ける遺伝子、インプリンティング遺伝子は父親由来ゲノム、あるいは母親由来ゲノムのどちらか片方からのみ発現する（このような発現様式は、片親性発現と呼ばれている）。多くのインプリンティング遺伝子は、染色体上でクラスターとなってインプリンティング領域を形成している。これまでにマウスで約 100 個のインプリンティング遺伝子と 15 カ所のインプリンティング領域が同定されており、ヒトでもほぼ同じ状況である。それぞれのインプリンティング領域には、父親アレルと母親アレルの間で DNA のメチル化状態の異なる部位（**differentially methylated region; DMR**）が存在している。特に精子や卵の形成過程でメチル化が確立される DMR は、**imprinting control region (ICR)** と呼ばれ、同一領域内の遺伝子の片親性発現を制御している。

精子、あるいは卵で確立された ICR のメチル化は、受精以降全ての体細胞で一生涯維持

される。一方、哺乳類の発生過程において、インプリンティング領域以外の大部分のゲノム領域では、受精直後から着床期にかけて DNA のメチル化が大幅に低下する。すなわち、発生初期においては、ゲノムワイドなエピジェネティック再編成が起こるが、インプリンティング領域はこの再編成を免れて、メチル化状態を維持する。しかし、どのようにインプリンティング領域とそれ以外の領域が区別されているのか、という分子機構については、ほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、インプリンティング領域の DNA メチル化制御機構を解明するため、ICR に結合する因子、特に DNA のメチル化状態によって結合能が変わる（メチル化感受性がある）タンパク質の網羅的な探索を目指した。そのために、標的領域の結合因子を単離するための新しい方法論、**engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP)** 法と、核移植技術によって作出された雌性発生胚および雄性発生胚から樹立した ES 細胞を利用することとし、そのための基盤作りを行なった。

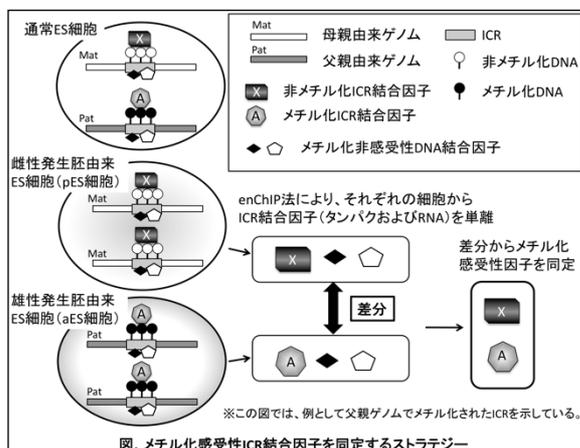
また、インプリンティング領域の ICR に結合する因子の候補を単離し、それらのインプリンティング制御機構における役割を検証した。

3. 研究の方法

enChIP 法は、近年ゲノム編集技術として注目されている、CRISPR/Cas9 システムを改変して使う。バクテリアの獲得免疫システムを利用した CRISPR/Cas9 システムでは、ヌクレアーゼである Cas9 が、ガイド RNA (gRNA) によって標的領域へと誘導され、DNA の二本鎖切断を行う。enChIP 法では、Cas9 の DNA 切断活性を失活させたもの

(dCas9) を細胞に発現させる。dCas9 は gRNA によって標的領域へと誘導されるので、細胞をホルムアルデヒドによってクロスリンクし、dCas9 に融合したタグペプチドに対する抗体を使って免疫沈降をすると、dCas9 と共に、標的領域、およびそこに結合しているタンパク質や核酸の複合体を沈降させることができる。沈降してきた複合体を脱クロスリンク後に質量分析やシーケンス解析することで、標的領域に結合しているタンパク質や RNA、相互作用しているゲノム領域を同定することができる (Fujita & Fujii, BBRC 2013)。本研究では、ES 細胞に dCas9 を安定的に発現させるためのレンチウイルスベクターを構築した。

通常の ES 細胞は、父親由来ゲノムと母親由来ゲノムを持っているので、各 ICR は、メチル化状態のものと非メチル化状態のものが同等に存在している。このような細胞では、enChIP 法によってメチル化 ICR 特異的な結合因子を単離することは難しい。一方、受精卵の核移植技術によって作出された、雌性発生胚 (parthenote) と雄性発生胚 (androgonote) から樹立した ES 細胞 (それぞれ pES 細胞、aES 細胞と呼ぶ) は、それぞれ母親由来ゲノムのみ、父親由来ゲノムのみを 2 本持つ。すなわち、これらの ES 細胞の ICR は、メチル化状態か非メチル化状態、どちらか一方の状態となっている。したがって、enChIP 法によってそれぞれの細胞から



ICR 結合因子を単離し、それらの差分をとることによって、メチル化 ICR 特異的結合因子と非メチル化 ICR 特異的結合因子を同定することが可能になると考えた。本研究では、pES 細胞および aES 細胞をクローニングし、ICR が想定されるメチル化状態となっているものを単離した。また、これらの ES 細胞を使って、enChIP 法により DNA メチル化感受性 ICR 結合タンパク質候補を同定し、それらの検証を行った。

4. 研究成果

(1) enChIP 法のための dCas9 発現レンチウイルスベクターの構築

レンチウイルスベクターは、理研より供与を受けた CSII ベクターをバックボーンとし、Addgene より入手した pX330 から guideRNA (gRNA) と Cas9 発現ユニットを利用した。クロマチン免疫沈降を効率よく行うために、dCas9 に PA タグを融合した (PA-dCas9)。また、PA-dCas9 発現細胞を薬剤選択するために、dCas9 に Puro 耐性遺伝子を、P2A ペプチドを挟んで繋げた。このベクターは、理研および Addgene に寄託した。



(2) enChIP 効率の検討

ICR の一つである IG-DMR を標的とする gRNA と PA-dCas9 を発現するマウス ES 細胞で、抗 PA タグ抗体を使って ChIP を行い、IG-DMR と非標的領域の ChIP 効率を比較した。gRNA の標的の IG-DMR は、インプットの約 5%が沈降したのに対し、非標的領域は約 0.05%であった。

(3) pES 細胞と aES 細胞のクローニング

pES 細胞と aES 細胞をクローニングし、ICR の DNA メチル化状態を調べた。本研究

では、3つの ICR (IG-DMR、H19-DMR、Snrpn-DMA) を調べた。通常の細胞では、IG-DMR と H19-DMR は父性アレルで高メチル化、Snrpn-DMR は母性アレルで高メチル化となっている。クローニングの結果、pES 細胞から、IG-DMR と H19-DMR のメチル化レベルが 2%以下、Snrpn-DMR で 100%のクローンを、aES 細胞から IG-DMR と H19-DMR のメチル化レベルが 98%以上、Snrpn-DMR で 0%のクローンを選定した。これ以降の実験は、これらの pES 細胞クローンと aES 細胞クローンを用いた。

(4) メチル化感受性 IG-DMR 結合タンパク質の探索

aES 細胞 (IG-DMR は高メチル化) と pES 細胞 (IG-DMR は低メチル化) で IG-DMR を標的とした enChIP を行い、SILAC 法により aES 細胞特異的または pES 細胞特異的な結合タンパク質を探索した。この解析では、高メチル化 IG-DMR 結合因子として、既知の Kap1 が同定され、この実験系が有意義であることが示唆された。そして、高メチル化 IG-DMR 結合タンパク質と、低メチル化 IG-DMR 結合タンパク質の候補を、それぞれ 3 個選定した。

これらの候補タンパク質を個別に検証したところ、DNA 損傷修復に関わる Parp1 が高メチル化 IG-DMR と H19-DMR および Snrpn-DMR に、クロマチンリモデリング因子の構成要素である Smarca5 が高メチル化 IG-DMR と H19-DMR に結合していることが示唆された。また、Smarca5 を過剰発現させた aES 細胞では IG-DMR と H19-DMR の DNA メチル化が低下した。しかし、両親性ゲノムをもつ通常の ES 細胞では、Smarca5 過剰発現による IG-DMR の低メチル化は起こらなかった。一方、体細胞から iPS 細胞を誘導するとき、Smarca5 を過剰発現させると、初期化効率が低下することが分かった。

これらのことから、enChIP 法により、高メチル化インプリント制御領域に結合する因子として Parp1 と Smarca5 を同定することができた。また、Smarca5 は過剰発現により DNA メチル化に影響を与える可能性が示唆された。今後、Smarca5 のエピジェネティック制御への関与をより詳細に解析していく必要がある。

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 4 件)

- ① Sekita, Y., Nakamura T, and Kimura T. Reprogramming of germ cells into pluripotency. World Journal of Stem Cells. Vol 8 (8) : 251-259, 2016. DOI: 10.4252/wjsc.v8.i8.251 査読あり
- ② Kimura, Y., Oda, M., Nakatani, T., Sekita, Y., Monfort, A., Wutz, A., Mochizuki, H., and Nakano, T. CRISPR/Cas9-mediated reporter knock-in in mouse haploid embryonic stem cells. Sci Rep. Vol 3 (5) :10710, 2015. DOI: 10.1038/srep10710. 査読あり
- ③ Nakatani, T., Yamagata, K., Kimura, T., Oda, M., Nakashima, H., Hori, M., Sekita, Y., Arakawa, T., Nakamura, T., and Nakano, T. Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced γ H2AX accumulation. EMBO Report. Vol 16 (5) : 323-326, 2015. DOI: 10.15252/embr.201439427. 査読あり
- ④ Arakawa, T., Nakatani, T., Oda, M., Kimura, Y., Sekita, Y., Kimura, T., Nakamura, T., and Nakano, T. Stella controls chromocenter formation

through regulation of Daxx expression in 2-cell embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 466 (1) : 60-65, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.106> 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① 第 15 回幹細胞シンポジウム (2017 年 5 月、東京)「Identification and analysis of imprinting control region-binding proteins」Sekita, Y., Yoshimura, Y., Fujii, H., Kimura, T.
- ② 第 15 回幹細胞シンポジウム (2017 年 5 月、東京)「AKT promotes somatic cell nuclear reprogramming through α -KG」Matsumoto, A., Sekita, Y., Kawasaki, Y., Sugiura, Y., Konno, R., Koder, Y., Kohda, T., Ishino, F., Kimura, T.
- ③ 第 15 回幹細胞シンポジウム (2017 年 5 月、東京)「Essential roles of Snf5 in female germ cell sex differentiation」Ito, T., Sekita, Y., Roberts, C., Kimura, T.
- ④ 第 15 回幹細胞シンポジウム (2017 年 5 月、東京)「Physiological roles of the genes expressed during maternal zygotic transition」Kanzaki, S., Wakabayashi, M., Takada, S., Sekita, Y., Kimura, T.
- ⑤ 第 39 回日本分子生物学会 (2016 年 12 月、横浜)「enChIP 法によるゲノムインプリンティング制御領域結合因子の網羅的探索」吉村裕樹、関田洋一、藤井穂高、木村透
- ⑥ 第 39 回日本分子生物学会 (2016 年 12 月、横浜)「AKT シグナルは α ケトグルタル酸を介して体細胞核の初期化を促進する」松元愛香里、関田洋一、川崎佑樹、杉浦悠毅、紺野亮、小寺義男、

幸田尚、石野史敏、木村透

- ⑦ 第 38 回日本分子生物学会 (2015 年 12 月、神戸)「細胞の初期化過程でのシグナル伝達経路の役割」関田洋一、木村透

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関田 洋一 (SEKITA, Yoichi)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号：20431950