

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07130

研究課題名(和文) エピゲノム研究を革新する統合的エピゲノム制御システムの開発と個体モデルの創出

研究課題名(英文) Development of an integrated epigenome regulation system and animal model for epigenomic disease

研究代表者

伊関 大敬 (Iseki, Hiroyoshi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：50433652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エピゲノムの異常が関与する疾患の発症メカニズムの解明や治療の開発には、エピゲノム疾患モデル動物の作製が必須である。そこで本研究では、ゲノム編集技術CRISPRを基盤とした個体レベルで複数の標的エピゲノムを同時にON/OFF制御可能な統合的エピゲノム制御システムを開発を試みた。本研究成果として、遺伝子発現を促進する新規エピゲノム制御システムを開発した。また、既知のエピゲノム編集技術を用いて統合的エピゲノム制御システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CRISPRを基盤とした統合的エピゲノム制御システムを構築した。エピゲノムを自在に制御できるシステムを構築することは、エピゲノム疾患モデルの作製のみならず、エピゲノムそのものを解析するツールとしても有用であり、また、エピゲノム疾患の治療への応用やiPS細胞誘導等の細胞運命変換への応用なども可能なため、学術的にも社会的にも重要な成果となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop an integrated epigenome regulation system and animal model for epigenomic disease. We developed a novel CRISPR-based system for enhancing gene expression. We further constructed an integrated epigenome regulation system with two CRISPR-associated proteins.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピゲノム CRISPR モデル動物

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの体を構成する全ての細胞は同一のゲノム(塩基配列)を持つが、エピゲノム(ゲノム上の修飾: DNAのメチル化やヒストンのメチル化、アセチル化等)は細胞種によって固有の状態を示す。エピゲノムは遺伝子の発現制御に関与しており、エピゲノムの違いは遺伝子発現の違いを生み、その違いが細胞の性質(種類や機能)を規定する一因となっている。従って、エピゲノムを人為的に操作し遺伝子発現を制御できれば、細胞の性質を目的に応じて変えること(細胞運命変換)ができると考えられる。

一方、ゲノムの異常が様々な疾患の原因となるのと同様に、エピゲノムの異常が疾患の原因となると考えられている。実際に、がんや肥満、糖尿病、精神疾患などでは特定領域のエピゲノムに異常が見られ、これらの疾患とエピゲノムの変異との関連性が示唆されている。特に、がんのエピゲノム研究は先行しており、正常細胞(正常組織)との比較から、大腸癌や胃癌など様々なヒトがん検体でエピゲノムの異常が報告されている。これら疾患発症メカニズムの解明や治療には、個体でエピゲノムを統合的に操作し遺伝子発現を自在に制御できるシステムが必須である。しかしこれまでのエピゲノム編集技術の報告は細胞レベルが主であり、エピゲノム疾患モデル動物の作製には至っていない。

エピゲノム編集には、2つの機能ドメイン(機能的なタンパク質立体構造単位: DNA結合ドメインとエピゲノム修飾ドメイン)を持つタンパク質が必要であり、使用するドメインの種類やその組み合わせによって標的特異性や効果等が異なる。近年の動向として、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9)を応用したエピゲノム編集技術が国外より報告されており、DNA切断活性欠損型 Cas9 (dCas9) タンパク質を DNA 結合ドメインとして利用した人工タンパク質により、細胞レベルでエピゲノム編集が可能であることが示されている(Konermann et al, Nature 2013, Mendenhall et al, Nat.Biotechnol.2013, Maeder et al, Nat.Biotechnol. 2013, Amabile et al, Cell 2016, Liu et al, Cell 2016)。

## 2. 研究の目的

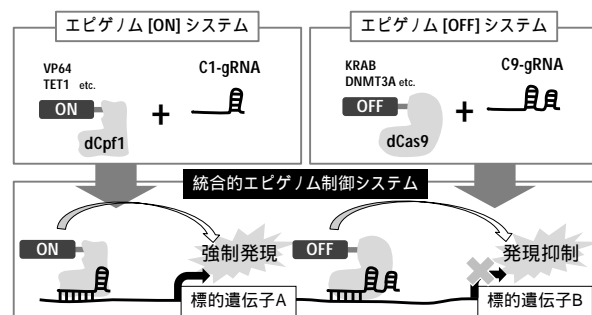
本研究では、CRISPR ゲノム編集技術を基盤とした個体レベルで複数の標的エピゲノムを同時に ON/OFF 制御可能な統合的エピゲノム制御システムを開発することを第一の目的とした。また、構築した統合的エピゲノム制御システムをマウスに導入し、容易に利用可能な遺伝子改変マウスを作製し、エピゲノム疾患モデルを作製することを第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CRISPR ゲノム編集技術を基盤とした統合的エピゲノム制御システムの構築

エピゲノム[ON]システムの構築のため、遺伝子発現の促進(ON)に働くエピゲノム修飾酵素あるいはその足場タンパク質と DNA切断活性欠損型 Cpf1 (dCpf1) との融合タンパク質(ドメイン)を発現するベクターを作製した。エピゲノム[OFF]システムの構築のため、遺伝子発現の抑制(OFF)に働くエピゲノム修飾酵素あるいはその足場タンパク質(ドメイン)と dCas9 との融合タンパク質を発現するベクターを作製した。統合的エピゲノム制御システムはエピゲノム[ON]および[OFF]を組み合わせ構築した(図1)。

図1. 統合的エピゲノム制御システムの構築



### (2) エピゲノム[ON/OFF]システムの評価

各発現ベクターの遺伝子発現促進・抑制効果をルシフェラーゼアッセイで評価した。発現ベクターをルシフェラーゼレポーターベクターと共に 293FT 細胞に導入し、2 日後にルシフェラーゼ活性を測定した。dCpf1 および dCas9 はガイド RNA 依存的に DNA に結合するため、dCpf1 または dCas9 特異的ガイド RNA (C1-gRNA/C9-gRNA) を共導入した。また、レポーターベクターとして、Nanog 遺伝子の発現制御領域(プロモーター)依存的にルシフェラーゼを発現する Nanog-luc ベクターまたはミニマムプロモーター依存的にルシフェラーゼを発現する minP-luc ベクターを用いた。

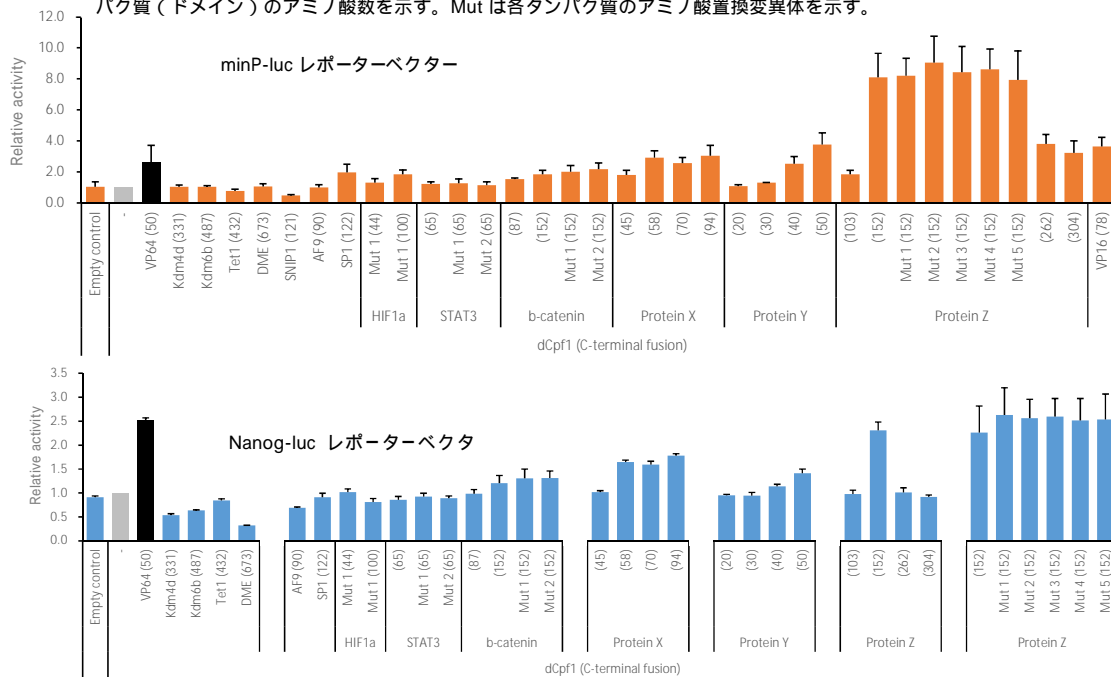
## 4. 研究成果

### (1) 新規エピゲノム[ON]システムの開発

dCpf1 の C 末端にエピゲノム修飾酵素の酵素活性ドメインやその足場ドメイン(転写制御因子の転写活性化ドメイン等)を融合した発現ベクターを作製し、dCpf1 融合タンパク質の遺伝子発現促進効果を検討した(図 2)。既報の dCpf1-VP64 (VP16TAD DALDDFDLML x 4 回繰り返し配列)

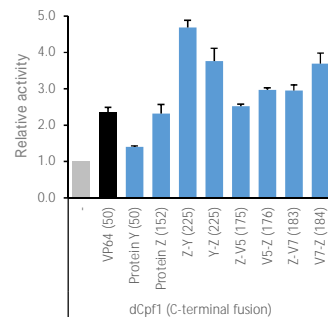
をポジティブコントロールとしルシフェラーゼアッセイを行った結果、minP-luc レポーターベクターを使用した場合で約 2.5 倍の促進効果がみられた。同様に検討した計 34 種類の dCpf1 融合タンパク質のうち、タンパク質 X、タンパク質 Y(dCpf1-Y)、タンパク質 Z (dCpf1-Z)、VP16 との dCpf1 融合タンパク質において dCpf1-VP64 と同等以上の効果がみられた。Nanog-luc レポーターベクターを用いた結果では、dCpf1-Z に dCpf1-VP64 と同等の促進効果がみられた。

図 2. 新規エピゲノム[ON]システムの開発: dCpf1 に対する相対的ルシフェラーゼ活性を示す。( ) 内の数字は各タンパク質(ドメイン)のアミノ酸数を示す。Mut は各タンパク質のアミノ酸置換変異体を示す。



次に、上記いずれのレポーターでも最も活性が高かった dCpf1-Z に、タンパク質 Y、V5 (VP16TAD 5 アミノ酸×4 回繰り返し配列)、V7 (VP16TAD 7 アミノ酸×4 回繰り返し配列) をそれぞれ組み合わせた dCpf1 融合タンパク質発現ベクターを作製し、遺伝子発現促進効果を検討した(図 3)。タンパク質 Z とタンパク質 Y、V5、V7 とのいずれの組み合わせにおいても、タンパク質 Z 単独に比べ促進効果が亢進された。特に、タンパク質 Z に続きタンパク質 Y を連結した dCpf1-Z-Y 融合タンパク質においては、両タンパク質の相乗効果により約 4.7 倍の促進効果を示し、単独の効果に比べ 2 倍以上の促進効果がみられた。更に dCpf1-Z-Y 融合タンパク質に V7 タンパク質 (v) を連結した融合タンパク質を 7 通り作製し、遺伝子発現効果を確認したところ、3 つの dCpf1 融合タンパク質 (vZY、ZvY、ZvYv) で促進効果が亢進された(図 4)。また、dCpf1-vZY 融合タンパク質の N 末端または C 末端に各種タンパク質(ドメイン)を融合し、同様に検討を行ったところ、3 つの転写活性化ドメイン (SP1、β-catenin、E2F1) との組み合わせで促進効果の亢進がみられた(図 5)。N 末端と C 末端の連結部位の違いによる効果について比較すると、協調的な促進効果を示した上記 3 つのいずれの転写活性化ドメインにおいても N 末端側に連結した場合に、より促進効果の亢進がみられた(図 5)。既知の転写活性化ドメイン VPR (VP64-p65AD-Rta) を N 末端に連結した融合タンパク質 VPR-dCpf1-vZY においては、dCpf1-vZY に比べ約 5 倍、dCpf1-VPR に比べ約 1.5 倍(データ未掲載)の促進効果を示した。

図 3. 2 種タンパク質の協調効果 (Nanog-luc レポーター)



以上、本研究においてタンパク質 Z および Y を用いた新規エピゲノム[ON]システムを構築した。また、他の転写活性化ドメインを組み合わせることで更なる遺伝子発現促進効果を示す dCpf1 融合タンパク質を作製することに成功した。

図 4. 3 種タンパク質の協調効果 (Nanog-luc レポーター)

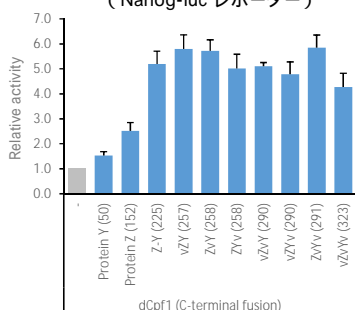
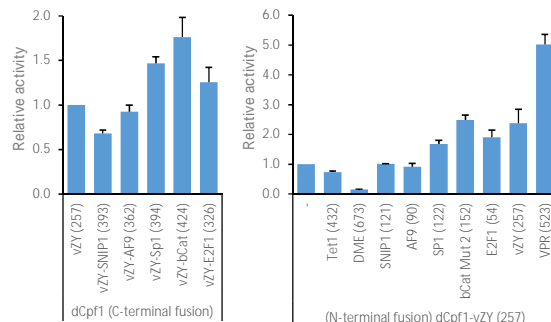
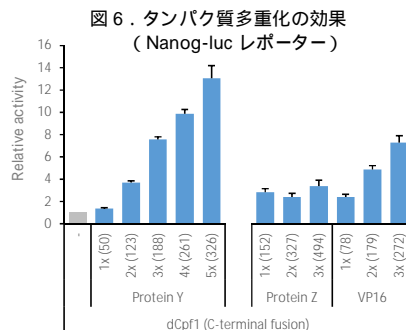


図 5. 4 種 6 種タンパク質の協調効果 (Nanog-luc レポーター)



一般的に転写活性化ドメインの繰り返し（多重化）により遺伝子発現促進効果を亢進することが知られているため、タンパク質 Y および Z においても同様の効果があるか検討した。既報の結果と同様に、VP16 の多重化により促進効果が亢進した（図 6）。タンパク質 Y を 2~5 の多重化を検討したところ、多重度に依存的に促進効果が増強された（図 6）。一方、興味深いことに、タンパク質 Z の多重化による効果はほとんどみられなかった（図 6）。タンパク質 Y は 50 アミノ酸と小さく、かつ多重化により大きく促進効果が増強できることから、サイズが小さくかつ活性の高い dCpf1 融合タンパク質を作製できる可能性がある。現在、タンパク質 Z および多重化 Y の組み合わせの効果を検討し、促進効果が高かつサイズの小さい改良版エピゲノム [ON] システムの構築を行っている。また、タンパク質 Z の多重化においては何故効果がないのか不明であり、そのメカニズム等の解明は今後の課題である。



## (2) 新規エピゲノム [OFF] システムの開発

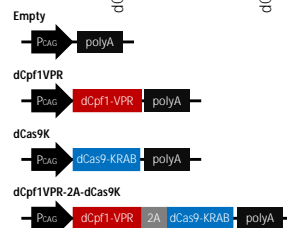
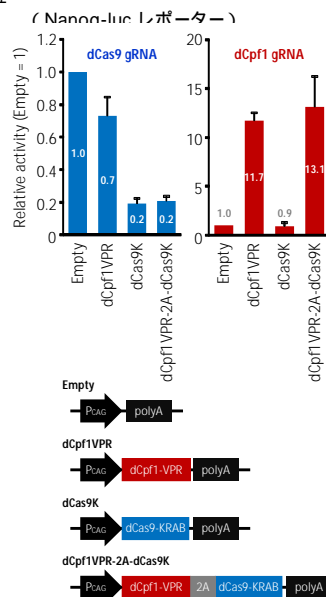
dCas9 の C 末端にエピゲノム修飾酵素の酵素活性ドメインやその足場ドメインを融合した発現ベクターを作製し、dCas9 融合タンパク質の遺伝子発現抑制効果を検討した。結果として、既報の dCas9-KRAB に比べ優れた抑制効果を示す dCas9 融合タンパク質は得られなかった。そのため現在は、dCas9-KRAB の改良からより効果的なエピゲノム [OFF] システムの構築を目指し、dCas9-KRAB にエピゲノム修飾酵素の酵素活性ドメインやその足場ドメインを組み合わせることを検討している。

図 7. 統合的エピゲノム制御システムの検証

## (3) 統合的エピゲノム制御システムの構築

新規エピゲノム [ON/OFF] システムについてはまだ開発途中であるため、既報の dCpf1 融合タンパク質 dCpf1-VPR、dCas9 融合タンパク質 dCas9-KRAB および 2A ペプチドの連結により両タンパク質を発現するベクターを作製し、統合的エピゲノム制御システム dCpf1-VPR-2A-dCas9-KRAB の構築を行った。各ガイド RNA 依存的に遺伝子発現を促進または抑制できるカルシフェラーゼアッセイを用いて検証した結果、dCas9 特異的ガイド RNA 存在下では遺伝子発現が抑制され、dCpf1 特異的ガイド RNA 存在下では遺伝子発現が促進された。

dCpf1-VPR-2A-dCas9-KRAB を発現する遺伝子改変マウスを作製するために、dCpf1-VPR-2A-dCas9-KRAB をマウス Rosa26 遺伝子座ターゲティングベクターにクローニングし、ガイド RNA 依存的に遺伝子発現を促進または抑制できることを確認した（データ未掲載）。構築したシステムのベクター長は約 25kb と大きいため、遺伝子改変マウスの作製は容易ではなく本研究期間内に遺伝子改変マウスの作製は達成できなかった。現在、引き続き導入方法等について見直し、遺伝子改変マウスの作製を検討している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dinh TTH, Iseki H, Mizuno S, Mizuno S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Kato K, Hamada Y, Hasan ASH, Suzuki H, Murata K, Muratani M, Ema M, Kim JD, Ishida J, Fukamizu A, Kato M, Takahashi S, Yagami KI, Wilson V, Arkell R, Sugiyama F.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cables2 Is a Novel Smad2-Regulatory Factor Essential for Early Embryonic Development in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1101/744128">https://doi.org/10.1101/744128</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Dinh TTH, Iseki H, Mizuno S, Iijima-Mizuno S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Kato K, Takahashi S, Yagami K, Sugiyama F.
2. 発表標題 Cables2 regulates mouse gastrulation by stimulating Wnt/ -catenin signalling pathway.
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tra Thi Huong Dinh, Hiroyoshi Iseki, Seiya Mizuno, Saori Mizuno, Yoko Tanimoto, Yoko Daitoku, Kanako Kato, Noriko Kajiwara, Masatsugu Ema, Jun-Dal Kim, Junji Ishida, Akiyoshi Fukamizu, Mitsuyasu Kato, Satoru Takahashi, Ken-ichi Yagami, Fumihiro Sugiyama
2. 発表標題 Essential role of Cables2 gene for gastrulation of the mouse embryo
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	柳沢 正史  (Yanagisawa Masashi)	筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・教授  (12102)	
研究協力者	高橋 智  (Takahashi Satoru)	筑波大学・医学医療系・教授  (12102)	
研究協力者	杉山 文博  (Sugiyama Fumihiro)	筑波大学・医学医療系・教授  (12102)	