

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08324

研究課題名（和文）成体生理機能における胎生期形成DNAメチル化修飾の役割

研究課題名（英文）Role of DNA methylation establishment during embryonic period in adult physiology

研究代表者

岡野 正樹（OKANO, Masaki）

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：50360863

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、胎生期におけるゲノムDNAの化学修飾変化が、出生後の健康や生理機能にどのような長期的影響を及ぼすか明らかにすることを旨とし、DNA化学修飾を調節する重要な酵素Dnmt3aに着目し、その機能を人為的に操作できる系を開発した。マウスES細胞を用いてDnmt3a遺伝子を改変し、その機能が停止した状態（OFF）から正常状態（ON）に回復できる新規のDnmt3a遺伝子アレルを作り出し、細胞実験系で動作することを検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で作製したDnmt3a遺伝子アレル(Dnmt3a-floxSTOP)は、胎生期におけるエピジェネティック状態変化の役割や長期的影響を明らかにするためのあらたなツールとなりうる。近年、胎生期・発達期といったライフステージの初期において経験する環境因子が、将来の健康と疾患のかかりやすさに影響を及ぼしうると考える学説が注目されている。本研究がそのしくみの基礎的理解に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：With the aim of elucidating the long-term effects of fetal changes in DNA chemical modification on health and physiological function after birth, we have developed an experimental system which enables us to manipulate gene function of Dnmt3a, a critical enzyme for regulating DNA chemical modification. Using mouse embryonic stem cells, we engineered Dnmt3a gene to generate a mutant allele which conditionally restores its function from deficient state to normal state. We validated its operation in embryonic stem cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNAメチル化 エピジェネティクス ES細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスはクロマチンの構造や化学修飾を介して細胞記憶を調節するしくみである。哺乳類の胚発生において、受精卵のエピジェネティック情報の多くは一度消去され、着床とともにあらたな胚のエピジェネティック状態が形成される。胎生期における低栄養状態などの環境因子が、出生後の発達や成体における生理機能に影響を及ぼすことが知られており、この現象を説明するしくみのひとつとしてエピジェネティクスが想定されている。しかし、胎生期のエピジェネティクス状態変化が成体の生理機能に影響を及ぼすことを示唆する報告は多いものの、その因果関係を明確に示した例は限られていた。

### 2. 研究の目的

我々はエピジェネティクス機構のひとつ、DNAメチル化を形成する過程に重要な役割を果たすDNAメチル化酵素 Dnmt3a に着目し、胎生期特異的に Dnmt3a の機能を停止させ、その後その機能を正常状態に回復させることができれば、胎生期における DNAメチル化変化の影響を成体で検証することができると考えた。本課題では、Dnmt3a 遺伝子を改変し、その機能を欠損状態 (OFF) から正常状態 (ON) へ機能回復できる実験系を構築することを目指した。

### 3. 研究の方法

- (1) Dnmt3a 条件的遺伝子機能回復アレル (Dnmt3a-floxSTOP) の作製  
CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、Dnmt3a 遺伝子のイントロン内に、転写伸長を遮断する配列 (flox-STOP) を挿入した。挿入部位近傍のゲノム相同領域配列と各種制御配列・機能遺伝子から構成されるプラスミド DNA (ターゲティングベクター) を作製し、Cas9/sgRNA 発現プラスミドとともにマウス ES 細胞へ導入した。
- (2) Dnmt3a-floxSTOP アレルにおける機能回復の検証  
Dnmt3a 遺伝子の一方のアレルは機能欠損、他方のアレルに flox-STOP が挿入された *Dnmt3a<sup>floxSTOP/-</sup>* ES 細胞を作製した。その細胞へ薬剤誘導型 Cre 遺伝子を導入し、flox-STOP 配列を人為的に除去できる系を構築した。この細胞を用いて Dnmt3a-floxSTOP アレルが設計のとおり機能するかその動作を調べた。
- (3) マウスモデル作製のための Dnmt3a 遺伝子改変  
ES 細胞を介して Dnmt3a-floxSTOP マウスを作製するため、Dnmt3a-floxSTOP ターゲティングベクターと Cas9(D10A 変異型) Nickase を用いて ES 細胞 (C57BL/6) における Dnmt3a 遺伝子改変をおこなった。

### 4. 研究成果

- (1) ターゲティングベクター構築: 内在性 Dnmt3a 遺伝子の転写伸長を遮断し、条件的に除去することが可能な配列 (flox-STOP) を、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によって Dnmt3a 遺伝子座に挿入した。ターゲティングベクターは以下の要素から構成される (図 1A)。 (i) flox-SA-IRES-Neo-STOP (pA): 機能欠損/回復を切り替える基本ユニットは、内在性遺伝子の転写産物をトラップする SA (スプライシング受容配列)、キャップ非依存的に翻訳開始できる IRES (内部リボソーム進入部位 Internal ribosomal entry site)、薬剤耐性により相同組換え細胞を選択する Neo (Neomycin/G418 耐性遺伝子)、転写伸長を停止させる "STOP" 配列 SVpA (SV40 由来転写終了配列) からなり、Cre 組換え酵素依存的に挿入配列を除去するため両端を loxP 配列で挟む (flox)。 (ii) CAG-rtTA-IRES-PacGfp: さらに、Tet-On 機能を付与するためテトラサイクリン制御性転写調節因子 rtTA と、flox-STOP カセット除去の指標となる PacGfp (薬剤ペニシリン耐性と蛍光機能をもつ融合タンパク質) を CAG プロモーター制御下で発現するユニットをもつ。Tet-On 機能は、時期特異的に誘導できる Cre マウスとして、テトラサイクリン (Dox) 誘導型 Cre マウス (TetO-Cre) (文献 1) を使用できるようにするためである。マウスにおける時期特異的 Cre 調節としてタモキシフェン誘導 Cre (CreER2, MerCreMer) が広く用いられている。しかし、妊娠マウスへのタモキシフェン投与は、着床とともに出産への影響がおおきいため低容量に抑える必要があり (文献 2)、本研究が想定する、妊娠期の胎仔で Cre 活性化を誘導し、出産後の子マウスの表現型を調べる実験においては、不完全な Cre 組換えや表現型解釈の複雑化などの困難が予想

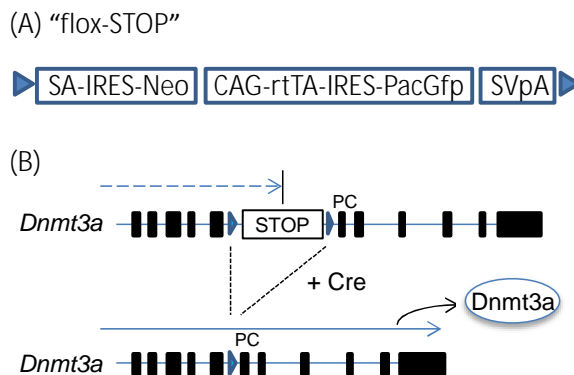


図1. (A) flox-STOP配列 (B) Cre依存的なDnmt3a遺伝子機能回復 (PC, 触媒中心をコードするエクソン)

される。Dnmt3a 遺伝子座における flox-STOP 挿入部位は、Dnmt3a 遺伝子の機能を完全に欠損させるため、酵素活性に必須な触媒中心(PCモチーフ)をコードするエクソンの5'上流側とし、予期せぬ組換え・構造異常を起こしやすい反復配列や、スプライシングによるスキップが予想される大きいイントロンを回避した位置に設定した(図1B)。以上の点を考慮し、ターゲティングベクター、(A) flox-SAIN-SVpA(挿入配列サイズ:3.7 kb)、(B) flox-SAIN-rtTA-IPG-SVpA(挿入配列サイズ:8 kb)を作製し、以降の機能検証をおこなった。

(2) Dnmt3a-floxSTOP アリルにおける条件的遺伝子機能回復の動作検証: まず CRISPR/Cas9 により Dnmt3a の触媒中心周辺をコードするゲノム領域(3.3kb)を欠失した Dnmt3a ヘテロ接合変異細胞(*Dnmt3a*<sup>+/−</sup>)を作製し、つづいて1箇所のみ残った正常 Dnmt3a 遺伝子アリルへ、(1)で作製した Dnmt3a-floxSTOP ターゲティングベクターを用いて floxSTOP 配列を挿入した。得られた *Dnmt3a*<sup>floxSTOP/−</sup> 細胞(一方は欠失アリル、他方は floxSTOP アリル)の RNA 転写産物を RT-PCR/RT-qPCR で解析したところ、floxSTOP 配列の5'上流側エクソンは転写されていたが、floxSTOP 配列の3'下流側エクソン(酵素活性に必須な触媒中心をコード)の転写はごく弱くしか検出されなかった。また、floxSTOP 配列がスプライシングでスキップされた場合に想定される転写産物は、Dnmt3a-floxSTOP アリルから検出されなかった。これらの結果は、我々が設定した挿入部位において floxSTOP 配列が Dnmt3a 遺伝子の転写伸長を有効に遮断したことを意味しており、少なくとも細胞実験系において Dnmt3a floxSTOP アリルは Dnmt3a 完全機能欠失変異と実質的に同等であると結論づけた。

次に、Dnmt3a-floxSTOP アリルにおける機能回復を検証するため、*Dnmt3a*<sup>floxSTOP/−</sup> ES 細胞に薬剤誘導性 Cre (MerCreMer)を導入した。同時に、floxSTOP 配列から発現するテトラサイクリン制御性転写調節因子 rtTA の動作を検証するため、テトラサイクリン応答性プロモーター制御下で蛍光タンパク質 mCherry を発現する TRE-mCherry も導入した(図2A)。この細胞に、薬剤誘導性 Cre を活性化するタモキシフェン(4OHT)を添加すると、loxP 配列で両端をはさまれた floxSTOP 配列がゲノム DNA から除去され、それまでごく弱くしか検出されなかった floxSTOP 配列の3'下流側エクソンにおける転写が顕著に上昇した。また Dnmt3a タンパク質(Dnmt3a2, ES 細胞における主要なアイソフォーム)の発現も回復した(図2B)。ただし、Cre の細胞毒性の影響と考えられる細胞増殖の低下状態での解析だったこともあり、親株である *Dnmt3a*<sup>+/−</sup> 細胞との同一条件での比較ができておらず、機能回復が完全であるかどうかの結論はでていない。さらなる検証が必要だが、floxSTOP 配列除去後は、イントロン領域に52塩基対(loxP 配列と制限酵素認識配列)が残る以外は、野生型 Dnmt3a 遺伝子と同じゲノム構造に戻るため、Dnmt3a 遺伝子の転写・タンパク質翻訳への影響は少ないのではないかと考えている。一方、4OHT 無添加条件ではテトラサイクリン(Dox)添加に反応して mCherry が発現誘導するが、4OHT 添加により floxSTOP 配列が除去されると、テトラサイクリンへの応答性は消失し、設計どおりに動作することを確認した(図2C)。このしくみは、Dnmt3a-floxSTOP アリルとテトラサイクリン応答性 Cre アリル(TetO-Cre)をもつマウスを作出した場合、Dox 投与により誘導された Cre が floxSTOP 配列を除去すると、Cre および rtTA の発現も消失することを意味する。このしくみによって、しばしば問題となる Cre や rtTA の毒性による影響(文献3,4)を最小限に抑えることが期待される。

検証実験の条件(ES細胞/野生型 Cas9/MerCreMer)において、作製した2種類のターゲティングベクター、(A) flox-SAIN-SVpA、(B) flox-SAIN-rtTA-IPG-SVpA は、ターゲティング効率や Dnmt3a 遺伝子の機能欠損/回復について同等に動作した。Cre 依存のカセット除去の効率について、(A) flox-SAIN-SVpA が高い傾向はあるものの、(B) flox-SAIN-rtTA-IPG-SVpA も適切に動作した。動物モデル作製のターゲティングベクターとして(B) flox-SAIN-rtTA-IPG-SVpA を用いることとした。

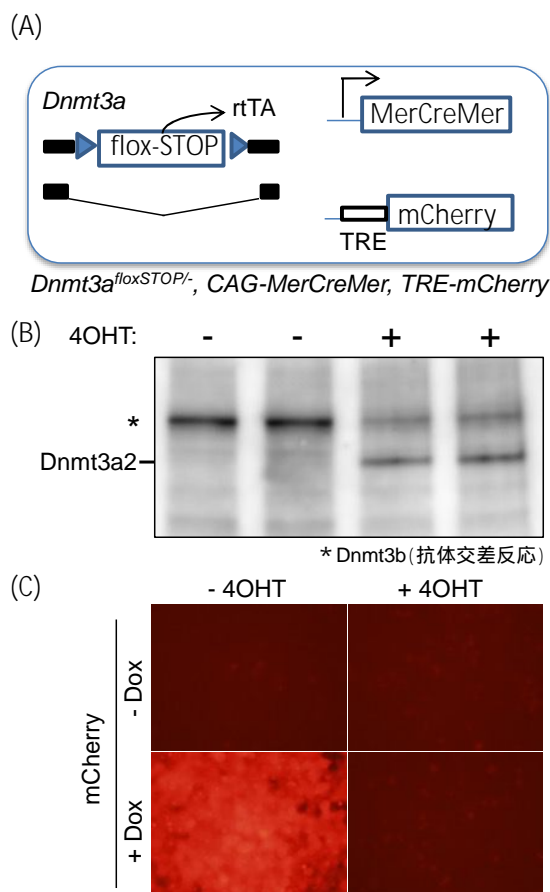


図2. (A) Dnmt3a flox-STOPによる条件的機能回復を検証するES細胞株(MerCreMer, タモキシフェン誘導性Cre; TRE, テトラサイクリン応答配列) (B) タモキシフェン添加(+4OHT)によるDnmt3aタンパク質の発現回復 (C) テトラサイクリン添加(+Dox)によるmCherry発現誘導がタモキシフェン依存的Cre活性化(+4OHT)によって消失する

(3) 動物モデル作製のための Dnmt3a 遺伝子改変: 受精卵を用いたマウス個体でのゲノム編集は短期間で相同組換え個体が得られる利点があるが、一方で目的の組換え個体を選別する検証過程に負担や困難がある。また、Dnmt3a 遺伝子のホモ変異は生殖細胞系列の異常(ゲノムインプリント、雄性生殖幹細胞形成)のため不妊となる(文献 5,6)。したがって、生殖系列を経由してマウス系統を樹立するためには、Dnmt3a 遺伝子の一方のアリルは正確にゲノム編集がおこなわれ、他方のアリルは正常な Dnmt3a 遺伝子構造が保たれている必要がある。我々は、比較的大きなサイズの配列を挿入することもあり、ES 細胞で Dnmt3a 遺伝子改変をおこない、正確なゲノム編集が検証された ES 細胞からモデルマウスを作製する方針をとった。正常な Dnmt3a 遺伝子アリルへの変異導入の可能性を抑えるため、DNA 二重鎖の 1 本だけ切断する D10A 変異型 Cas9 (Nickase) を使用し、同じ Dnmt3a-floxSTOP ターゲティングベクターとゲノム相同領域に対する複数の sgRNA を用いたゲノム編集をおこなった。野生型 Cas9 を用いた場合より効率は下がるが、十分に高い効率(75%)で相同組換えを起こした ES 細胞クローンが得られた。ただし、その半数は設計と異なる組換えあるいは非特異的挿入が同時に起きていることも明らかになり、ゲノム構造の検証による選別が重要であることが認識された。

#### <引用文献>

- (1) Perl et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002 99: 10482-87.
- (2) Yoshinobu et al. Experimental Animals 2021 70: 91-100.
- (3) Editorial, Nature 2007 449, 378
- (4) Morimoto and Kopan. Developmental Biology 2009 325: 171-78
- (5) Kaneda et al. Nature 2004 429:900-3
- (6) Dura et al. Nat Genet. 2022 54:469-480

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takebayashi Shin-ichiro, Ryba Tyrone, Wimbish Kelsey, Hayakawa Takuya, Sakaue Morito, Kuriya Kenji, Takahashi Saori, Ogata Shin, Hiratani Ichiro, Okumura Katsuzumi, Okano Masaki, Ogata Masato	4. 巻 10
2. 論文標題 The Temporal Order of DNA Replication Shaped by Mammalian DNA Methyltransferases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 266 ~ 266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10020266	査読の有無 有
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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------