

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19276

研究課題名（和文）エピジェネティクスの基本動作原理に基づくメチロームの合成

研究課題名（英文）Synthesis of methylome based on basic operating principles of epigenetics

研究代表者

伊藤 隆司（Ito, Takashi）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90201326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：内在性DNAメチル化を有しない出芽酵母をモデルに、人工的に導入したメチル化領域の維持に挑戦した。まず、メチル化が出芽酵母の生理機能に影響を与えないように、標的領域として大腸菌ファージDNA48.5 kbをHO遺伝子座に導入するゲノム編集法を確立した。併せて、必要なゲノム編集用ベクターシリーズの高度化とナノポアシーケンシングによるゲノム編集およびメチル化の検出系も構築した。更に、外来性DNAのメチル化維持のために、Cryptococcus neoformans由来の維持DNAメチレーズの誘導発現系を構築し、当該タンパク質の発現と核移行を確認した。これにより、上記の挑戦への基盤が構築された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来性メチル化DNAの安定な維持が可能になると、エピジェネティック情報を保持した形でのクローニングが可能になり、様々な応用の可能性が広がる。と同時に、メチル化領域の形成と維持も人工的に再現できれば、エピジェネティクス機構の構成的理解という意味でも大きな学術的意義が生じる。今回の成果は、こうした究極の目的に向けた挑戦の基盤が整備されたという点で一定の意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Our challenge is to maintain artificially introduced methylated DNA regions using budding yeast as a model, which lacks endogenous DNA methylation. First, we established a genome editing method to introduce the entire E. coli phage DNA (-48.5 kb) into the HO locus as a target region to ensure that its methylation does not affect the physiological functions of budding yeast. At the same time, we improved the yeast genome editing vector series and established a system to detect genome editing and methylation using nanopore sequencing. In addition, to maintain exogenous DNA methylation, we constructed an inducible expression system for the maintenance DNA methylase from Cryptococcus neoformans and confirmed the expression and nuclear localization of the protein. These results laid the foundation for our investigation towards the ultimate goal

研究分野：ゲノム科学

キーワード：DNAメチル化 構成的アプローチ Cas9 ナノポアシーケンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノムの設計と合成を行う合成ゲノミクスが急速に発展して、出芽酵母ゲノムの完全合成などの成果が上がりつつあった。一方、出芽酵母と異なり、ヒトを含む多くの真核生物のゲノム DNA では、シトシンの5位がメチル化を受けている。DNA メチル化はヒストン修飾と並ぶ2大エピジェネティック機構であり、広範な生命現象の制御に関わっている。そのため、機能的なゲノムの合成には、DNA メチル化への対応が必要になると考えられた。標的部位の DNA メチル化を制御する技術は CRISPR/Cas システムの利用によって大きく進歩したが、その制御は標的部位周辺という「局所」に留まり、「領域(ドメイン)」としての制御という真核生物メチロームの特性を再現するには至っていなかった。

2. 研究の目的

本課題では、出芽酵母をモデルに、DNA メチル化関連因子と CRISPR/Cas システムを駆使する独自の戦略によって、以下の3つの方法の開発に取り組む。

標的部位に導入されたメチル化をゲノム上で伝播拡張する方法 (Propagation)

の伝播拡張を任意の部位で阻止してメチル化領域の境界を規定する方法 (Delimitation)

で規定されたメチル化領域を DNA 複製後も安定に維持する方法 (Maintenance)

これらを組み合わせて出芽酵母ゲノム上でメチル化ドメインの自在な形成を実現し、メチローム合成の技術基盤を確立する。この過程は「開始・拡張・制限・維持」というエピジェネティック制御の素過程の実装でもあり、エピゲノム形成機構の構成的理解にもつながる。

3. 研究の方法

方法 については、メチル化された CG(^{5m}CG)を認識する Reader ドメインである哺乳類 MBD と、5mCG を生成する Writer 酵素である細菌由来 CG メチラーゼ M.SssI を融合したタンパク質 Reader-Writer Fusion(RWF)を出芽酵母で発現することによって、^{5m}CG に隣接する CG のメチル化を目指す。

方法 については、触媒不活性型 Cas9(dCas9)に脱メチル化酵素(Eraser)あるいは RWF を特異的に不活化する分子(Effector)を dCas9 に融合したタンパク質 dCas9-Eraser/Effector Fusion(dCEF)を作成し、これを適切な位置に配置してメチル化の伝播拡張阻止を試みる。

方法 については、驚異的効率を備えた維持メチル化酵素である真菌 *Cryptococcus neoformans* の DNA methyltransferase 5 (以下、CnDMT5 と略)を、その補助因子であるヘミメチル化 DNA 結合タンパク質 UHRF1 と共発現する株を作成することによって、メチル化パターンの娘細胞への継承を試みる。

但し、モデルとする出芽酵母ゲノムにメチル化を導入した場合、当該領域の機能に影響を及ぼす可能性がある。実際に de novo DNA メチラーゼの発現による出芽酵母の生育阻害を以前に経験している。そのため、ある程度の大きさを持った外来性のゲノム領域を出芽酵母ゲノム中に創出することが望ましい。

そこでゲノム編集によって、大きな外来性断片の標的部位への挿入をゲノム編集によって試みることから着手することとした。また、メチル化の伝播拡張には、導入されたメチル化の維持が必要であることから、方法 から開発に取り組むこととした。

4. 研究成果

1) メチル化標的としての人工的ゲノム領域の創出

出芽酵母の生育にとって必要な配列が存在せず、メチル化導入などの操作を行っても影響が皆無と予想され、しかも一定の大きさを有した“sand box”領域を創出することとした。具体的には、大腸菌 λ ファージ DNA を利用することとした。その理由は、大きさが 48.5 kb と適切であることに加えて、GC 含量が出芽酵母ゲノムより高い(50%)ので、*S. pyogenes* 由来 Cas9(*SpCas9*) の PAM (NGG) やメチル化標的配列となる CG の出現頻度が高まるためである。

挿入する部位としては、出芽酵母で古くから頻用されてきた safe harbor 部位である第 IV 染色体上の *HO* 遺伝子座を用いることとした。

第1段階として *HO* 遺伝子座を λ ファージ DNA の両末端部分に由来する配列で置換し、第2段階として両末端配列の接合部を Cas9 で切断した上で λ DNA を導入すれば、相同組換えによって目的とする置換が実現できると考えた(図1)。

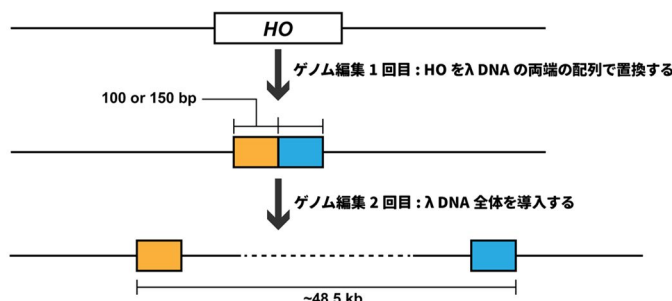


図1: *HO* 遺伝子座への λ DNA 挿入の戦略 1

実際に配列を検討したところ、 λ DNA の最初の 100 bp 配列 (F100) と最後の 100 bp 配列 (L100) を連結させた配列でも、同様に両末端に由来する 150 bp 配列 (F150 と L150) を連結した場合でも、*SpCas9* および *enAsCas12a* (改変型 *Acidaminococcus* sp.由来 *Cas12a*) の双方で接合部分に特異的 gRNA を設計できることが判明した。

そこで人工合成した F100-L10 と F150-L150 で *HO* 遺伝子を置換した株 *ho::lambdaF100L100* および *ho::lambdaF150L150* を作成した (第 1 段階)。これらの株に *RFA1-mNG* を持たせた上で接合部分に特異的 gRNA と *SpCas9* ないし *enAsCas12a* による切断を行った。二重鎖切断 (DSB) が誘導されて end resection が起これば、その結果として生成された 1 本鎖 DNA に mNeonGreen で標識された *Rfa1* を含む RPA 複合体が結合・集積し、蛍光強度の増加が顕微鏡下で観測できる。この方法を用いて gRNA を評価したところ、十分な効率で DSB を誘導できる gRNA を絞り込むことが出来た。これらの gRNA と Cas タンパク質を発現するプラスミドを λ DNA とともに形質転換して、ゲノム編集を試みたが、所期の成果を得ることが出来なかった。

第 2 の計画として、 λ DNA 全長を用いるのではなく、分割した PCR 断片を複数同時に形質転換することを試みた。具体的には、 λ DNA をカバーする相互に 100 bp の重複 (のりしろ) を有する 6 個の PCR 断片を用いることとした。また、所期の挿入が起こった株を遺伝的に選択できるように、3 番目と 4 番目の断片の間に *LEU2* マーカーを挿入することとし、PCR で調整した 7 種類の DNA 断片を同時に形質転換することを試みた (図 2)。

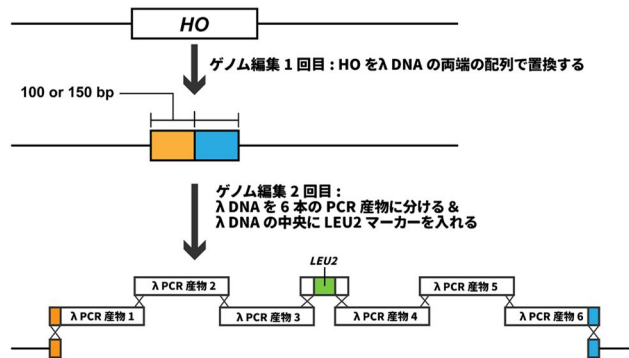


図 2 : *HO* 遺伝子座への λ DNA 挿入の戦略 2

HO::lambdaF100L100 および *HO::lambdaF150L150* から得られた *Leu*⁺クローン 48 個につき、*HO* 遺伝子座の配列と断片 1 ないし断片 6 との接合部 PCR を行ったところ、全てが陽性となった。更に、それ以外の断片に由来するアンプリコンも全て PCR で検出されたことから、所期の挿入が極めて高い効率で起こっていることが示唆された。

そこでナノポアシーケンシングを行い、*HO* ORF の上流配列と下流配列を有するリードを検索して、所期の配列 (中央部に *LEU2* が挿入された λ DNA) との間でドットプロット解析を行ったところ、所期の挿入が起こっていることが確認された。

これらのゲノム編集操作に伴うオフターゲット効果として、大きな構造変化が起きていないことを確認すべく、得られたリードの Flye による de novo アセンブリを試みた。得られたアセンブリと出芽酵母参照ゲノム配列との間で D-Genies によるドットプロット解析を行ったところ、第 IV 染色体 *HO* 遺伝子座位の λ DNA 挿入部位以外には大きな差が見られないことが判明した (図 3)。

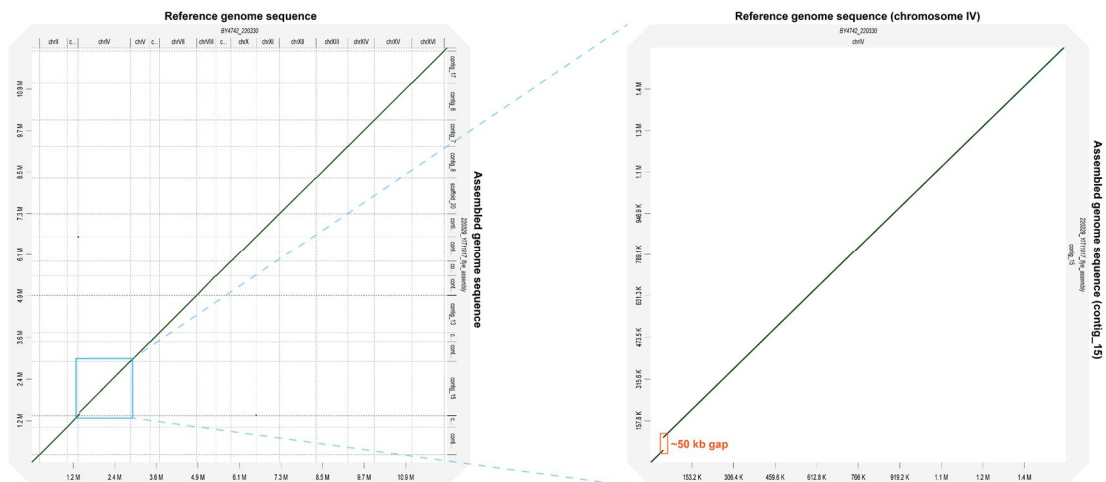


図 3 : *HO::lambda* 株と野生株のゲノム比較

以上の過程において得たノウハウを踏まえて、再度、DNA の直接挿入 (戦略 1) を試行錯誤しつつ条件の最適化を進めた結果、遺伝的マーカーによる選択なしでも 20% 程度の実用的効率で目的の株を得ることに成功した。

これらによって大型の断片をゲノム中に挿入するための基盤技術が構築されたと考えている。また、ナノポアシーケンシングによる解析の系も確立された。これにより、当初予定していた全

ゲノムバイサルファイトシーケンシングに依らないDNAメチル化解析も可能になった。

これらと関連して、ゲノム編集を効率的に進めるためのインフラとして、出芽酵母用ゲノム編集ベクターの改良も行った。以前に報告したシリーズをベースに選択マーカーの異なるシリーズを整備したことによって、既存の遺伝子改変に利用した選択マーカーとは異なるベクターを利用することが可能になり、ゲノム編集実験の実用面での柔軟性が高まった。と同時に、これらを用いることによって、3遺伝子座の同時編集も実用的な成功率で可能であることも確認された。これにより、複雑な構成の株を構築するステップを各段に加速することが可能になった。

2) 規定されたメチル化領域をDNA複製後も安定に維持する方法 (Maintenance)

DNAメチル化維持の根幹となる *C. neoformans* 由来の維持メチル化酵素 CnDMT5 を出芽酵母で発現するためのプラスミド構築を進めた。

メチル化酵素の発現が酵母の生育に悪影響を及ぼした経験を踏まえて、恒常的ではなく誘導性に発現可能なプラスミドとして *GAL1* プロモーターを利用することとした。ガラクトースによる発現誘導の他、人工転写因子 GEV を用いれば糖源をグルコースからガラクトースに変更せずに誘導を行うことも可能である。CnDMT5 の ORF のコドンは出芽酵母に最適化した。また、CnDMT5 の核移行が不十分であった場合に備えて、当研究室で有効性が確認された SV40 由来の bipartite nuclear localization signal (BPSV40NLS) を付加し、更に核移行を確認できるように mNeonGreen との融合タンパク質としたバージョンのプラスミドも作成した。LEU2 マーカーを有するセントロメア型 (YCp 型) プラスミドである (*pGAL1-CnDMT5-tADH1-CLeu* および *pGAL1-CnDMT5-BPSV40NLS-ymNeonGreen-tADH1-CLeu*)。

これらのプラスミドおよびバックボーンベクターを形質転換した株を得て、生育をグルコース存在下 (抑制条件) およびガラクトース存在下 (誘導条件) の双方で検討した。その結果、CnDMT5 の発現誘導は生育の悪影響を及ぼさないことが確認された (図4)。

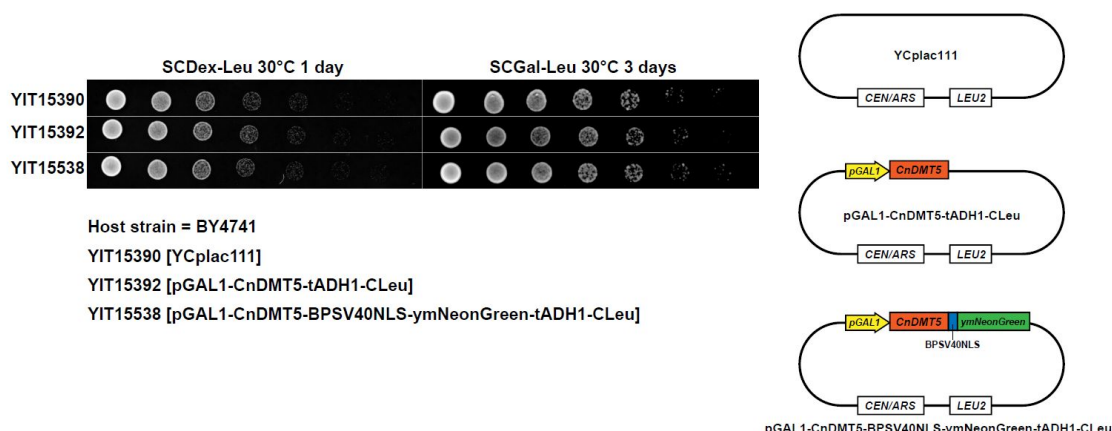


図4 : CnDMT5 発現誘導株の構築

更に、蛍光顕微鏡観察によって CnDMT5 タンパク質の発現誘導と核移行が確認できた。誘導条件の最適化を経て、細菌由来 DNAメチル化酵素 M.SssI によって CGメチル化処理を行ったプラスミドの形質転換を行い、ナノポアシーケンシングによるメチル化状況の検討を行い、CnDMT5 単独による維持メチル化能力の評価を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoshi Okada, Emiko Kusumoto, Takashi Ito
2. 発表標題 Simple-to-use CRISPR-SpCas9/SaCas9/AsCas12 vector series with multiple selection markers enabling single-step multiplex genome editing in budding yeast.
3. 学会等名 The Allied Genetics Conference 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024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	岡田 悟 (Okada Satoshi) (30734488)	九州大学・大学院医学研究院・助教 (17102)	

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
---------	---------