

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640131

研究課題名(和文) DNAメチル化紋様形成機構の構成的理解：合成エピゲノミクスへの挑戦

研究課題名(英文) Constitutive understanding of the mechanism to generate DNA methylation pattern: a challenge toward synthetic epigenomics

研究代表者

伊藤 隆司 (Ito, Takashi)

九州大学・医学(系)研究科(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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のゲノム機能は、ヒストン修飾やDNAメチル化などのエピジェネティック修飾のパターンによって制御されている。したがって、特定のパターンを人工的に形成できれば、意図した機能をゲノムに発揮させることが可能になるのみならず、そのパターンを形成する分子機構の実証にもなる。このような合成エピゲノミクスのアプローチの可能性を探るために、我々はCRISPR/Cas9のシステムを駆使して、酵母ゲノム中の特定遺伝子座のヒストン修飾パターンを改変し、意図した表現型の創出を試みた。

研究成果の概要(英文)：The pattern of epigenetic modifications including histone modifications and DNA methylation regulates the function of eukaryotic genome. Accordingly, if one can artificially generate a specific pattern, one may not only make the genome exert an intended function but also prove the mechanism underlying the formation of the pattern. To pursue the possibility of such synthetic epigenomics approaches, we exploited the CRISPR/Cas9 system to modify histone modification patterns at a specific locus in the yeast genome to confer an intended phenotype on the cells.

研究分野：ゲノム科学・分子生物学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 DNAメチル化 CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとは、環境や内因性のシグナルに応じて同一のゲノムを多様なパターンに読み分け、そのパターンを安定に保持・継承する機構であり、細胞分化や環境応答をはじめとして広範な生命現象を制御する。その中核となる DNA メチル化とヒストン修飾をゲノムワイドに読み出すエピゲノム解析は、次世代シーケンシングによって飛躍的進展を遂げ、新しい法則の発見が相次いでいる。更に、任意の配列を認識できるように設計可能なタンパク質 TALE や CRISPR を利用して、エピジェネティック修飾を部位特異的に書き込むことも実現し、エピゲノム解析が見出した様々な変化の実験的意義付けの途も拓かれつつある。

エピゲノム制御の仕組みは複雑で巧妙である。例えば、トランスポゾン抑圧のためのヘテロクロマチン形成を例にしても、DNA メチル化とヒストン修飾の巧妙な連携・多重フィードバックによる非線形な応答・ヘテロクロマチンといえども抑制性修飾因子のアクセシビリティは担保せねばならない絶妙な制御等々が、複雑に絡み合いながら全体としての頑強性を確保している。このように重層的で複雑なシステムにおいて何が本質的であるのかを把握するためには、基本動作を再現できる最少要素を同定する必要がある。しかし、構成因子をあらゆる組み合わせで破壊する解析的研究には限界があり、相補的なアプローチとして最小構成要素で基本動作の再現を目指す構成的・合成的研究が重要になる。

我々は独自のメチローム解析技術の開発の際にモデルとして利用したアカパンカビ *Neurospora* の DNA メチル化機構に興味を覚え、メチロームに加えてヒストン修飾やヌクレオソーム配置も含めた統合解析を進めてきた。その結果、ヌクレオソームに沿った DNA メチル化レベルが両端部で高まる U 字型を示すこと、可動性の高いヌクレオソームでは U 字の底が浅くなること、ヒストン H1 の欠如がメチル化の全体的亢進を生むこと、

3 塩基周期でメチル化が共起することを見出した。、は *Neurospora* で提唱されている H3 尾部への DNA メチレースのリクルートによる近接効果と考えることもできるが、、の成因については全く不明である。

2. 研究の目的

DNA と H3K9 がメチル化されない出芽酵母内で、標的ゲノム領域に H3K9 メチレースをターゲットングした上で、H3K9me3 を認識するクロモドメインを介して DNA メチレースをリクルートして、上記の DNA メチル化紋様が再現されるか否かを検証する。これにより、H3 尾部への DNA メチレースのリクルートによってメチル化紋様が形成されるとする仮説の可否を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、出芽酵母をモデル系として用いて、CRISPR/Cas9 の系を利用してエピジェネティック修飾酵素をゲノム中の特定遺伝子座位にリクルートすることによって、特異的なエピジェネティック修飾パターンの創出を試みて、合成エピゲノミクスの可能性を探るものである。そこで以下の段階を踏んで研究を行うことにした。

(1) dCas9 の標的部位へのリクルートの生細胞イメージング

本研究では、Cas9 のヌクレアーゼ活性を失わせた変異体 dCas9 を利用することにした。標的部位への dCas9 のリクルートを確認し、かつその効率を明らかにするために、dCas9 に蛍光タンパク質を融合させた dCas9-Venus の細胞内挙動を蛍光顕微鏡で観察することにした。検出感度を考慮に入れて、標的部位としては、ゲノム中に 100 コピー以上縦列反復している rRNA 遺伝子座と、10 コピー程度の縦列反復構造を取る CUP1 遺伝子座位を用いることにした。

rRNA 遺伝子座については核小体との一致を調べる必要があるため、核小体を視覚化する目的で核小体タンパク質に赤色蛍光タンパク質を融合した Nop1-mCherry を利用することにした。一方、CUP1 遺伝子座位については、銅の添加によって CUP1 遺伝子座位に誘導されてフォーカスを形成することが報告されていた転写因子 CUP2 に tdTomato を融合して視覚化を図ることにした。

更に CUP1 遺伝子座位については、リクルートメントをより詳細かつ厳密に検出する試みとして、二分子蛍光相補法 (Bimolecular Fluorescence Complementation; BiFC) を検討した。既報にしたがって二分割した Venus を dCas9 と CUP2 のそれぞれに融合したコンストラクトを利用した。

(2) dCas9 によるヒストン修飾酵素のリクルートメント

ヒストンアセチル化酵素 p300 のコア部分およびヒストン H3K9 メチル化酵素 DIM5 を dCas9 に融合したコンストラクトを作成して利用した。

(3) 表現型解析

CUP1 遺伝子座位の活性化は、様々な濃度の硫酸銅を含ませたディスクを酵母細胞のローン上に置くことで増殖阻止円を形成させるハロアッセイや、酵母細胞の希釈系列を様々な濃度の銅を含む培地にスポットするアッセイで検出した。

(4) sgRNA の確認

sgRNA が機能的であるか否かは、Cas9 タンパク質と *in vitro* で複合体を形成させた上で、標的配列をもつプラスミドと混合して切断活性を調べることによって確認を行った。

4. 研究成果

(1) dCas9 の生細胞イメージング

出芽酵母の rRNA 遺伝子座の配列に基づいて設計した sgRNA と dCas9-Venus を共発現した細胞を蛍光顕微鏡で観察した。この際、核小体を視覚化するために Nop1-mCherry も同時に発現させた細胞を用いた。両者の蛍光が一致したことから、dCas9 が標的部位にリクルートされたかに思われた。しかしながら、sgRNA を発現していない細胞においても、Venus の蛍光が核小体に集積することが見られたために、特異性に疑義が生じた。

哺乳類培養細胞系においても sgRNA がないと dCas9 が核小体に集積することが報告された上に、sgRNA による蛍光シグナルの増強は認められなかったため、sgRNA 自体が機能していない可能性が浮上した。そこで *in vitro* において Cas9 と複合体形成させて標的プラスミドの切断を検討したところ、問題なく切断活性を示し、sgRNA 自体の機能は確認された。続いて *in vivo* で sgRNA が適切に発現されていない、或いはプロセッシングされていない可能性についても検討を加えたが、そこにも問題がないことが明らかになった。これらの結果から、dCas9 自体が出芽酵母の核小体に集積する性質があることが判明したために、標的部位として rRNA 遺伝子座を利用することは断念した。

新たな標的遺伝子座位として CUP1 遺伝子座位の利用を検討した。CUP1 は酵母のメタロチオネインをコードしており、銅イオンの添加によって発現が誘導される。この誘導を司るのが転写因子 CUP2 である。通常の実験室株中では CUP1 遺伝子は 12 コピーの縦列反復構造を取っていることが知られている。これだけのコピー数があれば、蛍光タンパク質による可視化が可能であると考えて、CUP1 遺伝子座位に複数の sgRNA を設計して、dCas9-Venus と同時に発現させた。その結果、複数の sgRNA について核小体ではない核内に明確な蛍光の輝点を認めることが出来た。

こうして視覚化された蛍光輝点が CUP1 遺伝子座であることを確認するために、転写因子 CUP2 との共局在を調べた。CUP2 は銅イオンの添加とともに CUP1 遺伝子座にリクルートされるので蛍光タンパク質を融合させておくと、蛍光の輝点が形成されることが知られていた。そこで CUP1-sgRNA と dCas9-Venus と CUP2-tdTomato を共発現する細胞株を作成して、銅の添加前後で蛍光顕微鏡観察を行った。銅を添加する前の細胞では dCas9-Venus が核内に輝点を形成している。そこに銅を加えると核内に一様に存在していた CUP2-tdTomato が dCas9-Venus と重なる輝点を形成することが判明した。この結果は dCas9-Venus が正しく CUP1 遺伝子座にリクルートされて、そこを可視化できていたことを物語っている。

この点を更に厳密に追及するべく、BiFC の

実験を試みた。Venus を N 末と C 末の 2 つの部分に分割して CUP2 と dCas9 のそれぞれに融合させておき、CUP1 遺伝子座に対する sgRNA と共発現させると、銅イオンを添加した時のみ、蛍光輝点が核内に出現することが分かった。これは dCas9-Venus-C と CUP2-Venus-N が十分に近接した結果、Venus-C と Venus-N が相互作用して Venus が再構築されたことを意味している。したがって、dCas9 が CUP1 遺伝子座にリクルートされたことをより厳密な意味で示す結果である。

(2) dCas9 によるヒストン修飾酵素のリクルートメント

CUP1 遺伝子座位には dCas9 をリクルートできることが確認されたので、この dCas9 にヒストン修飾酵素を付加して、エピジェネティクスを変化させることを計画した。

最初にヒストンアセチル化酵素(HAT)である p300 の触媒コア部分を融合させた dCas9 をテストすることにした。酵母細胞は CUP2 遺伝子を欠くと、CUP1 遺伝子の誘導が不十分になって銅感受性を示す。CUP2 は HAT の一種である SPT10 を CUP1 遺伝子座にリクルートすることが知られている。したがって、CUP2 の代わりに dCas9 が p300 を CUP1 遺伝子座位にリクルートすれば、CUP1 遺伝子の基底発現レベルの上昇を招いて、銅感受性の抑圧が表現型として観察される可能性が高いと考えた。

実際に株を構築してテストしてみたところ、CUP2 欠損株は銅イオン濃度が 25 μ M でも生育が大きく阻害されていたが、適切な sgRNA と共発現させると dCas9-p300 がこの生育阻害を部分的ではあるが抑圧した。また、dCas9-p300 と sgRNA の有無が様々に異なる株を用いて八口アッセイを行ったところ、転写開始点上流に dCas9-p300 をリクルートした時のみ、生育阻止円の縮小、即ち銅耐性の向上が観察された。以上より、当初の想定通りに p300 が CUP1 遺伝子プロモーターのエピジェネティック修飾状態を変えて、基底発現レベルの上昇をもたらしたものと考えられた。

次にこの系を用いて *Neurospora* の H3K9 メチレーズである DIM5 をリクルートすることを試みた。H3K9 のメチル化はアセチル化と拮抗する可能性があり、更に H3K9 のリーダータンパク質である HP1 を共発現させると、CUP1 遺伝子が縦列反復構造を取ることも相俟って、ヘテロクロマチンを形成できる可能性もあると考えて実験を行った。

dCas9-p300 を用いた実験で有効性が認められた sgRNA を用いて dCas9-DIM5 のリクルートを行い、HP1-NeonGreen のスポット形成によるヘテロクロマチン形成の可視化を試みたが、研究期間内には所期の結果を得ることは出来なかった。

本研究は DNA メチル化紋様形成までには至らなかったが、その過程で合成エピゲノミク

スのための有用な基礎的知見と経験を得ることが出来た。今後は、CUP1 遺伝子座位に対する複数の sgRNA の同時発現等によって、dCas9-DIM5 のリクルート部位を拡張し、H3K9me3 の分布を広げることで HP1 によるヘテロクロマチン形成を促すことを検討したい。その上で H3K9me3 にリクルートされる DNA メチレーズを共発現させて、DNA メチル化紋様を形成させることを目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Miura, F. & Ito, T.

Highly sensitive targeted methylome sequencing by post-bisulfite adaptor tagging.

DNA Res. 22(1), 13-18, 2015. 査読有 DOI. 10.1093/dnares/dsu034

Colicchio, J.M., Miura, F., Kelly, J.K., Ito, T. & Hileman, L.C.

DNA methylation and gene expression in *Mimulus guttatus*.

BMC Genomics 16, 507, 2015. 査読有 DOI. 10.1186/s12864-015-1668-0

Yokoyama, T., Miura, F., Araki, H., Okamura, K. & Ito, T.

Change-point detection in base-resolution methylome data reveals a robust signature of methylated domain landscape.

BMC Genomics 16, 594, 2015. 査読有 DOI. 10.1186/s12864-015-1809-5

〔学会発表〕(計 4 件)

伊藤隆司

Post-Bisulfite Adaptor Tagging (PBAT) による高感度メチローム解析
第 8 回日本エピジェネティクス研究会
年会、2014/5/26、東京

Takashi Ito

Highly Sensitive Methylome Sequencing by Post-Bisulfite Adaptor Tagging: Whole-Genome and Targeted Approaches
IHEC2014, 2014/10/8, Vancouver

伊藤隆司

PBAT による高感度メチロームシーケンシング
第 42 回日本毒性学会、2015/7/1、金沢

伊藤隆司

次世代シーケンシングによる高感度一塩基解像度メチローム解析
第 28 回倍メディカル分析科学シンポジウム、2015/8/22、長崎

〔図書〕(計 2 件)

三浦史仁、伊藤隆司

バイサルファイト変換で全ゲノム DNA メチル化を定量する PBAT 法
次世代シーケンス解析スタンダード
(二階堂愛編集) pp.143-155、羊土社、2014

荒木啓充、伊藤隆司

エピゲノムのビッグデータ解析
ビッグデータ 変革する生命科学・医療
(永井良三、宮野悟、大江和彦 編集)
pp.58-64、2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表

伊藤 隆司 (ITO, Takashi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号 : 90201326

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

岡田 悟 (OKADA, Satoshi)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 30734488