

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670085

研究課題名(和文) ヒストン修飾酵素の機能に関する網羅的スクリーニング

研究課題名(英文) Comprehensive screening of histone modifying enzyme

研究代表者

中山 啓子 (Nakayama, Keiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60294972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムDNAが核内で存在するにあたって、その環境を整えているものがゲノムDNAが巻き付いているヒストンであり、ヒストンの翻訳後修飾はゲノムDNAの存在様式と機能を制御していると考えられている。そこでヒストンの翻訳後修飾の制御機構を明らかにすることが、ゲノムDNAの機能発揮メカニズムを理解する上で重要となる。

本研究では、様々な修飾酵素に変異を導入した細胞群を調製し、それらの細胞を長期培養や分化誘導することによって、どのような変異が導入された細胞群へ変化しうるかを調べることを最終的な目標に、遺伝子に変異を導入した細胞群の調製方法の検討を行い、効果的なプロトコルを決定した。

研究成果の概要(英文)：In the nucleus, core histones, which genomic DNA wrap around, create an environment of genome DNA. Post-translational modifications of histone are thought to regulate the shape of existence and function of genomic DNA. This means the significance to elucidate the regulatory mechanisms of post-translational modifications of histone.

In this project, the final goal was set as the generation of cell group which is consist of cells with mutation of various enzymes of modification, and the examination of change of constituent cells after long-term culture or induction of differentiation. Effective protocol of introduction of mutation was determined for several cell lines.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRISPR/Cas9 メチル化酵素 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒストンの翻訳後修飾は、転写を制御していることからポストゲノム時代に非常に注目されてきた。もちろんその前から、例えば Histone H3K27 メチル化酵素 PRC2 の変異が体節形成異常を引き起こすなどヒストン修飾酵素は発生に重要な役割を果たすことは知られていた。

これまでに、これら PRC2 複合体を含め多くのヒストン修飾酵素の機能を明らかにし、その生理的または病理的な意義を示そうという膨大な研究がなされてきた。例えば、酵素としての機能を調べるために *in vitro* 再構成した DNA/ヒストン複合体を基質とした解析を基質や供与体の特性が検証されたり、酵素の結晶構造解析から活性制御機構の解析、ゲノム上の局在を知るための抗修飾酵素抗体を用いた ChIP sequence、そして生理機能を検証するための遺伝子操作マウスの作製などである。そして、このような様々な手法から得られた結果を統合することで多くの機能が説明されている。しかしながら、プロテオミクス解析などから新規のメチル化酵素が次々と同定され、*in vitro* 再構成や結晶構造解析からは多くの機能ドメインが存在することが示唆されており、これらについて機能解析は未だ途上である。それら一つ一つについて細胞内または個体内の機能の探索が求められているが、遺伝子欠損細胞やマウスを作製することには膨大な時間とコストが必要とされる。

そこで、本研究課題では、CRISPR/Cas9 システムの利点を活用し、さらに超並列ゲノム解析を適応することで、ヒストン修飾酵素や活性ドメイン候補を網羅的かつ容易に決定する方法の開発を目指した。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas9 システムを利用して細胞の遺伝子破壊または遺伝子変異の導入を行う。

クローニングせずに次世代シーケンサーでゲノムを解析することで、どのような遺伝子改変が行われた細胞が、培養細胞として生存可能なのか、さらに分化誘導などに適しているのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 導入ベクターの作製

すでに市販されているキット「PrecisionX Cas9 SmartNuclease System (SBI)」を用いて、遺伝子破壊を NIH3T3 細胞で行う。遺伝子発現を抑制するために転写開始点付近のゲノムを欠失させるようにベクターを作製する。遺伝子破壊効率を PCR で判定できるように破壊が予想される周辺にプライマーを設定する。遺伝子破壊効率が十分には高くない場合 (< 80%) には、遺伝子破壊部位に薬剤耐性遺伝子 (Puromycin 耐性遺伝子など) が挿入されるように改変を行い、遺伝子導入後 Puromycin で細胞を選択することで遺伝子導入効率を高める。

(2) 細胞への導入条件による導入効率の検討

(1) で作製したベクターを NIH3T3 細胞に導入する。PCR によって導入効率を判定する。

また、遺伝子破壊が行われていれば、転写が抑制されることが期待されるので、細胞より mRNA を調製し、cDNA を合成、定量的 PCR を用いて、転写量を定量し、遺伝子破壊効率を算出する。

4. 研究成果

(1) 導入ベクターの作製

これまでの研究で、がん遺伝子 RAS を過剰発現すると転写が抑制されることを見いだしている遺伝子 *Ephx1* と *Itgb5* をモデル遺伝子として用いることとした。これらの遺伝子の転写開始点から上流約 1kb、下流約

1kb 付近に CRISPR-Cas 認識配列を含む guide RNA を設計し、DNA を合成、発現ベクターに組み込んだ。このベクターは、ヒト U6 プロモーターの制御下に guideRNA を、普遍性トリ β アクチンハイブリッドプロモーター (CBh) の制御下に Cas9 を発現するベクターであり、U6 プロモーター下に転写開始点上流の guide RNA または下流の guide RNA を挿入したベクターを用意し、これら二種類のベクターを同時に NIH3T3 細胞 1×10^5 個に電気穿孔法を用いて遺伝子導入した。

(2) 導入細胞のクローニング

遺伝子導入後、5 日目の細胞の一部からゲノム DNA を調製し、遺伝子破壊を PCR で確認したところ、非常に微弱であるが、遺伝子破壊を示す遺伝子増幅が確認できたので、効率は低いもの遺伝子変異が導入されていると考えた。遺伝子導入後、7 日目に細胞を 1 well あたり 0.5 個となるように、96 well plate に播種し、さらに 2 週間程度培養を継続した。この間、各 well を観察することで、単一クローン化されていることを確認した。

(3) 遺伝子破壊細胞のスクリーニング

単一クローンは細胞増殖を待って、ゲノム DNA および mRNA を調製した。ゲノム DNA では、期待された遺伝子欠失が起これば、遺伝子増幅が起こるようなプライマーと、欠失によって増幅が不可能となるようなプライマーを設定し、各セットを用い PCR を行うことによって、得られた細胞の遺伝子型を野生型・heterozygous mutant・homozygous mutant と判定した。一方で、mRNA より cDNA を調製し、遺伝子発現を定量的 PCR によって確認し、遺伝子破壊の有無を判定した。

(4) 遺伝子破壊細胞のスクリーニング結果

第一回目のスクリーニング結果を以下

に示す。

	欠失細胞	PCR による変異確認	RNA による欠失確認
<i>Ephx1</i>	4/32	10/24	2/8
<i>Itgb5</i>	0/29	5/25	0/4

Ephx1 遺伝子を欠失した細胞は、ゲノム PCR による確認とともに mRNA の発現量を調べて、発現が失われていることが確認され、遺伝子が両アリルで欠失されたと考えた。

一方で、*Itgb5* 遺伝子は欠失が得られなかった。そこで、heterozygous mutant の細胞に再度同様の遺伝子導入を行い、遺伝子欠失を誘導した。50 クローンをスクリーニングしたが、やはり遺伝子欠失細胞を得ることができず、*Itgb5* は細胞生存に必須の遺伝子であろうと考えた。

現在、*Itgb5* cDNA を導入することで過剰発現した細胞を作製し、この細胞で内因性の *Itgb5* 遺伝子の欠失の誘導を行っている。

また、遺伝子欠失効率が、既存の報告に比し低く、同時に一つの細胞で遺伝子欠失を誘導することは困難であることが予想された。そこでさらに導入効率が良いベクターを用意し、どのような実験を行うこととした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Nakagawa, T., Lv, L., Nakagawa, M., Yu, Y., Yu, C., D'Alessio, A. C., Nakayama, K., Fan, H. Y., Chen, X. & Xiong, Y. CRL4(VprBP) E3 Ligase Promotes Monoubiquitylation and Chromatin Binding of TET Dioxygenases. Mol Cell, 査読有, 57 巻, 2015, 247-260

DOI:10.1016/j.molcel.2014.12.002.

Izumi, R., Niihori, T., Suzuki, N.,

Sasahara, Y., Rikiishi, T., Nishiyama, A., Nishiyama, S., Endo, K., Kato, M., Warita, H., Konno, H., Takahashi, T., Tateyama, M., Nagashima, T., Funayama, R., Nakayama, K., Kure, S., Matsubara, Y., Aoki, Y. & Aoki, M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: a report of two siblings. *Neuromuscul Disord*, 査読有, 24 巻, 2014, 1068-1072

DOI: 10.1016/j.nmd.2014.07.008

Kondo, Y., Ninomiya, M., Kimura, O., Machida, K., Funayama, R., Nagashima, T., Kobayashi, K., Kakazu, E., Kato, T., Nakayama, K., Lai, M. M. & Shimosegawa, T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PLoS One*, 査読有, 9 巻, 2014, e98521

DOI: 10.1371/journal.pone.0098521

Fujiwara, T., Fukuhara, N., Funayama, R., Nariai, N., Kamata, M., Nagashima, T., Kojima, K., Onishi, Y., Sasahara, Y., Ishizawa, K., Nagasaki, M., Nakayama, K. & Harigae, H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia. *Ann Hematol*, 査読有, 93 巻, 2014, 1515-1522.

DOI:10.1007/s00277-014-2090-4

[学会発表] (計 5 件)

福本恵美子, Kundu, Lena Rani, 佐藤聡一郎, 細金正樹 & 中山啓子, マウス ES 細胞における geminin の細胞周期と分化に対する制御, 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014/11/27

細金正樹, 舟山亮, 城田松之 & 中山啓子, H3K27me3 修飾パターン形成過程の時系列解析, 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014/11/27

久志瞭, 中川直, 中野星児, 遠藤尚博 & 中山啓子, 精子形成における E3 コピキチンリガーゼ -TrCP の新規基質の同定と解析, 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014/11/25

Nakagawa, Tadashi & Nakayama, Keiko, TFIID complex changes accompany epithelial-mesenchymal transition (EMT), 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014/11/25

中山啓子, がん遺伝子による転写変化とエピゲノム変化, 第 23 回長崎障害者支援再生医療研究会, 長崎大学医学部良順会館 (長崎県長崎市) 2014/11/4

[その他]

ホームページ等

<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中山 啓子 (NAKAYAMA, KEIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 60294972

(2) 研究分担者

舟山 亮 (FUNAYAMA, RYO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 20452295