

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06657

研究課題名(和文)非コードゲノム領域の強制転写技術を利用した革新的DNAメチル化制御技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel long non-coding RNA mediated DNA methylation editing system

研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)

星薬科大学・先端生命科学研究所・特任助教

研究者番号：50757432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はゲノム上の特定領域のDNAメチル化状態のみを特異的に制御できる技術の確立を目的としている。DNA脱メチル化に関わるタンパク質に翻訳されない200塩基以上の長鎖非コードRNAの強制転写を用いた方法については期待した効果は得られなかった。一方で、任意のDNA配列を認識するDNA結合ドメインとDNAメチル化制御酵素ドメインを融合させた人工融合遺伝子を用いた手法ではゲノム上の特定領域のDNAメチル化状態を非常に高い効率で制御可能であることが明らかになった。本研究で開発された技術は、基礎から臨床研究までの幅広い分野に渡るDNAメチル化研究を大きく前進させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims at establishing a technology that can specifically control the DNA methylation status of a specific genome region. A method using forced transcription of long noncoding RNA (200 bases or more), which do not translated into a protein, failed to obtain sufficient transcription efficiency and the expected effect was not obtained. On the other hand, using an artificial fusion gene obtained by fusing a DNA binding domain called dead Cas 9, which can be customized to recognize an arbitrary DNA sequence, and DNA-methylation-modifying enzyme domain, I succeed to manipulate DNA methylation levels of a specific genome region with very high efficiency. The technology developed in this research is expected to greatly advance DNA methylation research over a wide range from basic to clinical research.

研究分野：エピゲノム編集

キーワード：エピゲノム編集 DNAメチル化 エピジェネティック CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の発生・分化過程におけるDNAメチル化制御の重要性は広く理解されている。しかし、人為的に特定ゲノム領域のDNAメチル化状態を特異的に制御する実用的な技術が未だ存在しないため、DNAメチル化が生体内で実際に果たす役割については殆ど検証できていなかった。

(2) 申請者らは任意ゲノム配列への特異的結合能を持つTALEとDNAメチル化関連遺伝子DNMT3LのC末ドメインの融合タンパク質であるTALE-DNMT3L(C)を用いて、DNAメチル化制御が可能であることを確認していた。しかし、TALEは任意配列認識部位の作製に手間がかかる難点があった。また、TALE-DNMT3L(C)によるDNAメチル化制御はDNMT3Lが二量体形成によりDNAメチル化酵素DNMT3Aをリクルートできることを利用したものであるため、特性上TALE-DNMT3L(C)による配列特異的DNAメチル化制御は数個のCpGにのみ影響を与える配列特異性の非常に高いものであり、広範囲のDNAメチル化制御には不向きであった。

2. 研究の目的

本研究は申請者らの今までの研究を進展させ、任意ゲノム配列認識ドメインとして、TALEと同様に任意配列への結合能を持つが共発現させる20塩基程度のガイドRNA(gRNA)配列依存的に認識配列が決定されるため、対象配列の変更が容易なdead Cas9 (dCas9)を用いて、DNAメチル化が生体内で及ぼす影響を詳細に検証するための「人為的なゲノム配列特異的DNAメチル化制御を可能にする実用的な技術」の確立を目的とした。

3. 研究の方法

実用的なゲノム配列特異的DNAメチル化制御技術の開発にあたり、(1) dCas9とDNAメチル化制御酵素の融合タンパク質によるDNAメチル化制御と、(2) 長鎖非コードRNA(lncRNA)の強制転写によるDNAメチル化制御の2つの手法について検討した。手法(1)においてdCas9と融合させるDNAメチル化制御酵素として、DNMT3Aのメチル化酵素部位に加えて、DNMT3Aのメチル化酵素部位とDNAメチル化補助因子DNMT3LのC末端を連結させた融合遺伝子が、DNMT3A単体よりもDNAメチル化酵素活性が上昇することから、DNMT3A酵素部位とDNMT3LのC末端を連結させた融合遺伝子(DNMT3A&L)の2つを選択した。逆に配列特異的DNA脱メチル化を誘導するDNAメチル化制御酵素として、DNA脱メチル化に関わるTet2の酵素ドメインと、植物でのみ発現しているDEMETERと呼ばれるメチル化DNAグリコシラーゼを選択した。また、横浜市立大学木原生物学研究所の木下哲教授より完全長DEMETERのクローニングコンストラクトを譲渡していただき、DEMETERのメチル化DNAグリコシラーゼ活性を持つ酵素部位のクロー

ニングに利用させていただいた。手法(2)は配列にGを多く含むlncRNAの転写がオープンクロマチン形成に関わるという申請者らの報告を元に発想している(引用文献①)。dCas9と転写活性化因子VP64の融合タンパクdCas9-VP64が任意のゲノム領域で転写を引き起こすことができるため、dCas9-VP64をlncRNAの強制転写の為に使用した。

4. 研究成果

(1) 配列特異的DNAメチル化制御の検証にはマウス神経芽細胞腫Neuro2Aを用いた。配列特異的DNAメチル化制御の対象としては、インプリンティング領域であるIgf2/H19ローカスにおいてDNAメチル化によるインプリンティング遺伝子発現制御に関与していることが示唆されているimprinted control region(H19-ICR)と、DNAメチル化によって発現が制御されていることが古くから示唆されている脳神経由来栄養因子BDNFのアルタナティブプロモーターであるエキソン4(BDNFex4)上流領域を対象とした。バイサルファイトシーケンスによる検証の結果、Neuro2AではH19-ICR領域は両アリルとも完全にメチル化されており、BDNAex4上流領域は完全に脱メチル化されていた。そのため、H19-ICR領域を配列特異的なDNA脱メチル化のターゲット、BDNFex4上流領域を配列特異的なDNAメチル化のターゲットとして選択した。

(2) 上記の系を用いて、必要なレンチウイルスベクターが先に完成したdCas9-VP64によるlncRNAの強制転写を介したH19-ICR領域のDNA脱メチル化制御法についての検証を行った。レンチウイルスによるdCas9-VP64の遺伝子導入はうまくいったものの、遺伝子外領域の強制転写を促しうるgRNAの設計が予想外に困難であり、gRNAの変更による改善を試みたが有効な効果は得られなかった為、dCas9と各種DNAメチル化制御酵素ドメインを用いた配列特異的DNAメチル化制御法の確立を優先することとした。

(3) ドキシサイクリン依存的に活性化されるプロモーター下にdCas9と各種DNAメチル化制御酵素ドメイン融合遺伝子を繋げたレンチウイルスベクターを作製した後、レンチウイルス化してNeuro2Aに導入した。これらの遺伝子を導入された細胞のみを10日間のネオマイシン処理によって選別した。これらの細胞に対してドキシサイクリンによる発現誘導を行い、定量PCRによってそれぞれの発現が誘導されていることを確認した。その後、それぞれの領域を対象にしたgRNAを同様にレンチウイルスによって導入した後、ピュロマイシン処理によって選別した。7日間のドキシサイクリン処理後にこれらの細胞からDNAを採取し、バイサルファイトシーケンスによってターゲット領域のDNAメチル

化レベルを検証したところ、DNA メチル化レベルの変化はわずか数パーセントに留まった。変換効率の改善を量るため、論文報告を元に gRNA 骨格の変更や、dCas9 への複数の DNA メチル化制御ドメインの融合等を行ったが、変換効率の大きな改善は見られなかった。また、dCas9 融合遺伝子はそれだけでレンチウイルスで導入できる限界の長さに近いいため、さらにドキシサイクリン制御システムと薬剤選択システムを組み合わせるとレンチウイルスで導入できる DNA のサイズを超えてしまい、高タイトルのレンチウイルスの作成が非常に困難であるという問題が生じていた。これらの問題の解決のため、群馬大学の畑田出穂教授の研究チームに協力をあおいだ。同研究チームは SunTag と呼ばれる複数の GCN4 ペプチドで標識した dCas9 と、GCN4 ペプチド特異的な結合能をもつミニ抗体 scFV と DNA 脱メチル化関連酵素 Tet1 の融合タンパク質を共発現させることで 100% 近い変換効率をもった配列特異的 DNA 脱メチル化システムの構築に成功したという報告を発表している (引用文献②)。畑田教授が構築されたミニ抗体システムのベクターを一部譲渡していただき、それらをベースとしてレンチウイルスベクターを構築し直した。この時、DNA メチル化/DNA 脱メチル化酵素の両方について新たにベクターの構築を行ったが、ミニ抗体システムとして報告がなかった DNA メチル化亢進方向への制御についての検証結果のみを示す。5 つの GCN4 ペプチドで標識した dCas9、scFV と DNMT3A&L、BDNFex4 上流領域に対する gRNA のそれぞれをコードする 3 つのレンチウイルスを Neuro2A に導入した結果、BDNFex4 上流領域に配列特異的な DNA メチル化が誘導できることが確認できた (図 1)。また、dCas9 と DNA メチル化制御ドメインを分割することでベクターサイズの大幅な縮小が可能となり、高タイトルのレンチウイルスが作製できる事が明らかとなった。

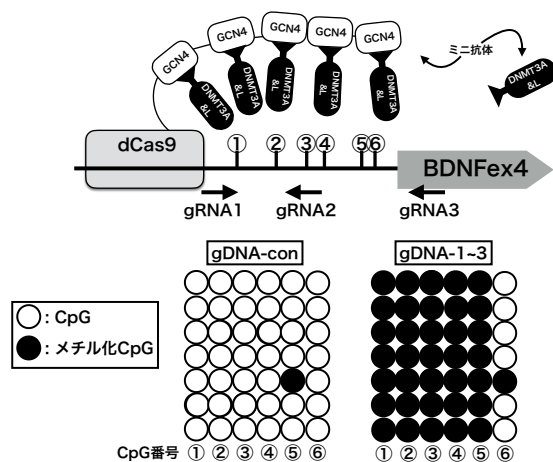


図 1 レンチウイルスを用いた配列特異的DNAメチル化

(4) *in vivo* での配列特異的 DNA メチル化制

御を考えた場合、レンチウイルスは感染細胞のゲノムを改変してしまうという点と、生体内で弱いながら免疫反応を起こしてしまうため、遺伝子キャリアとしてはそれらの問題が生じにくいアデノ随伴ウイルス (AAV) がより望ましい。AAV にレンチウイルスで構築したと同様のミニ抗体による DNA メチル化制御システムを載せ替える場合、AAV はレンチウイルスよりも許容限界となるベクターサイズが小さく、今まで用いてきた *Streptococcus pyogenes* 由来の dCas9 それ単体で AAV の許容限界長を越えてしまう。そのため、*Staphylococcus aureus* 由来のより小さい dCas9 (dSaCas9) を用いた上、GCN4 ペプチドによる標識を 3 つに減らす必要があった。GCN4 ペプチドで標識した dSaCas9、scFV と DNMT3A と DNMT3 (C) の融合遺伝子を 2 つの別々に組み込んだ AAV ベクターを作製し、BDNFex4 上流領域を対象とする gRNA を発現する AAV ウィルスとして Neuro2A に導入した結果、Neuro2A において BDNFex4 上流領域に配列特異的な DNA メチル化が誘導できることが確認できた (図 2)。

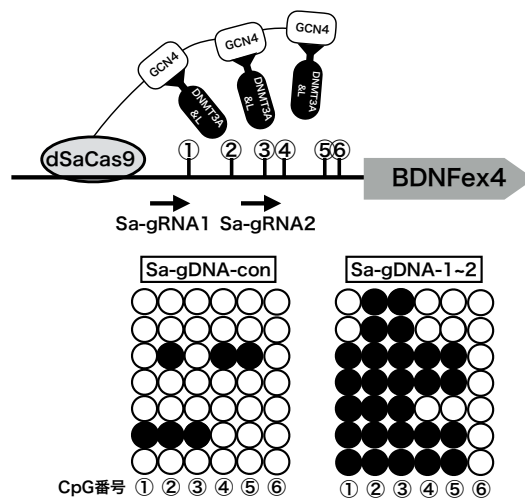


図 2 AAVを用いた配列特異的DNAメチル化

(5) 本研究は当初計画していたシステムが効率よく機能せず、目的とする実用的な配列特異的 DNA メチル化技術の開発を達成する為に大幅な見直しを図らなければならない事態となった。しかし、ミニ抗体を用いたシステムを導入できたことにより、簡便かつ高効率な配列特異的 DNA メチル化制御に成功した事から、実用的な DNA メチル化制御ツールの作製という本研究の骨子となる目標は達成されたと考えられる。また、本研究で問題となった DNA メチル化変換効率の低さや、作成したレンチウイルスのタイトルの低さは本研究に先んじて報告された dCas9 と DNA メチル化制御酵素ドメインの融合タンパク質による配列特異的 DNA メチル化制御システムにおいても同様に生じている (引用文献③)。本研究によって開発されたレンチウイルス、あるいは AAV による高効率な配列特異的 DNA メチル化制御システムはそれらの問題点を

克服しているため、既存の DNA メチル化制御システムと比較しても、ツールとしての明確な優位性が存在している。そのため、本研究で開発された技術は、*in vitro* のみならず *in vivo* においてもこれからのエピゲノム研究を推進する上での基盤と成り得る技術であると考えられる。

<引用文献>

- ① Yamamoto N, Agata K, Nakashima K, Imamura T. Bidirectional promoters link cAMP signaling with irreversible differentiation through promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) expression in PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jun 20;44(11):5105-22.
- ② Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, et al. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol.* 2016 Oct;34(10):1060-5.
- ③ Liu XS, Wu H, Ji X, Stelzer Y, Wu X, Czauderna S, et al. Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell.* 2016 Sep 22;167(1):233-247. e17.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

山本直樹 他、ニューサイエンス社、月刊細胞 6 月号「エピゲノム研究技術開発の最前線」、2017、40-45

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)
星薬科大学・先端生命科学研究所・特任助教
研究者番号：50757432

(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

木下 哲 (KINOSHITA, Tetsu)
畑田 出穂 (HATADA, Izuhō)