

令和元年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03281

研究課題名(和文) 生細胞内での部位特異的なエピゲノム操作法の確立

研究課題名(英文) Sequence specific detection and manipulation of epigenetic status

研究代表者

今西 未来 (Imanishi, Miki)

京都大学・化学研究所・講師

研究者番号：80362391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：メチル化シトシン(5mC)は転写の調節に重要で、発生や分化、発癌などに関わっている。さらに、RNAのメチル化の重要性も明らかになりつつある。本研究では、核酸のメチル化修飾を生きた細胞内で配列特異的に検出、制御する技術の開発を目指して、(1)特定のゲノム配列中におけるシトシンのメチル化を選択的に認識できるDNA結合タンパク質の開発および、(2)デザインしたメチル化識別タンパク質を用いた生細胞内でのメチル化検出、(3)RNAメチル化制御技術の基盤構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたメチル化シトシン選択性を有するDNA結合ユニットを利用することで、メチル化状態に依存したゲノム改変や転写調節が実現する。すなわち、正常細胞には影響を及ぼさず、メチル化機構に異常をきたしたガン細胞のみに作用するといった、副作用の少ない遺伝子標的治療への応用も期待される。また、本システムを利用して、従来の網羅的なメチル化解析に続くステップである「個々のメチル化の意義」に答えることで、エピゲノムの重要性が示唆されている発ガン、発生、分化、体内時計のメカニズム解明や創薬標的の決定、未だ萌芽的なRNAメチル化研究の推進に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Methylated cytosine (5mC) is important for the regulation of transcription, and is involved in development, differentiation, carcinogenesis, etc. Furthermore, the importance of RNA methylation is also becoming clear. In this study, with the aim of developing a technique for DNA/RNA sequence-specific detection and control of the methylation status in living cells, I focused on the following points; (1) Development of DNA binding protein capable of selectively recognizing cytosine methylation in a specific genomic sequence, (2) detection of methylation in living cells using designed methylation discrimination protein, and (3) Detection and control of RNA methylation status.

研究分野：タンパク質化学

キーワード：核酸結合タンパク質 核酸修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メチル化シトシン (5mC) は転写の調節に重要で、発生や分化、発癌などに関わっていることが明らかにされてきた。さらに、RNA のメチル化として、N6-メチルアデノシン (m6A) が数千もの機能遺伝子に存在すること (*Nature*, **485**, 201 (2012)) が網羅的解析から明らかにされたのを皮切りに、m6A がマイクロ RNA (miRNA) の成熟 (*Nature*, **519**, 482 (2015))、幹細胞の分化 (*Cell Stem Cell*, **15**, 707 (2014))、体内時計機能 (*Cell*, **155**, 793 (2013)) などに重要であることが報告され、広義には RNA のメチル化を含む、エピジェネティックな制御の生命活動への重要性が注目されていた。一方、DNA や RNA のメチル化を検出する方法は、細胞侵襲性のシーケンズ解析および、生きた細胞内で用いられるものは、核酸の配列に依存しない方法のみであった。研究開始直前には、生きた細胞内で配列選択的な認識や制御が可能な方法として、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術が飛躍的に発展し、DNA 配列特異的な遺伝情報の書き換え、遺伝子発現制御など、ゲノムそのものを標的とした生細胞内での機能制御が可能になった。一方、CRISPR-Cas9 システムでは、そのゲノム配列認識様式がガイド RNA を介したワトソン-クリック塩基対形成に限られるため、塩基修飾を区別することが困難であった。また、ジンクフィンガータンパク質や Transcription Activator-like Effector (TALE) などの配列特異的な DNA 結合タンパク質を用いたゲノム編集技術を含めても、核酸の修飾状態依存的に細胞内で機能を発揮できるゲノム編集ツールは存在せず、配列特異的なメチル化を検出したり制御したりすることは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、核酸のメチル化修飾を生きた細胞内で配列特異的に検出、制御する技術の開発を最終的な目標とした。この目標に向けて、(1) 特定のゲノム配列中におけるシトシンのメチル化を選択的に認識できる DNA 結合タンパク質の開発および、(2) デザインしたメチル化識別タンパク質を用いた生細胞内でのメチル化検出、(3) RNA メチル化制御技術の基盤構築を行った。

3. 研究の方法

(1) 特定の配列中におけるシトシンのメチル化を選択的に認識できる DNA 結合タンパク質の開発

Transcription Activator-like Effector (TALE) は、DNA 結合繰返しユニット中の可変アミノ酸により認識塩基が決まり、独立性の高い複数個の DNA 認識ユニットから構成される。そこで、結晶構造や生化学実験から TALE ユニット中の塩基認識に関わることが示されているループ部分のアミノ酸をランダム化し、5mC 選択的新奇ユニットのスクリーニングを行った (図)。まず、TALE の DNA 塩基認識ユニット中の、可変アミノ酸とその周辺4残基をランダム化した TALE 発現ライブラリーを作製した。特に、TALE の標的 DNA 配列として、大腸菌の内在メチル化酵素「Dcm メチラーゼ」の認識配列をレポーター遺伝子のプロモーター領域に組込むことにより、大腸菌内でレポーター遺伝子プロモーターが Dcm メチラーゼによるメチル化を受け、結果として、5mC に結合する TALE ユニットを探索することが可能になるシステムを構築した。Bacterial 1-Hybrid (B1H) 法 (*Meth. Mol. Biol.*, **786**, 79 (2012)) をベースにして、申請者らが新しい DNA 結合特異性をもつ TALE のスクリーニングに最適化したシステム (*BBRC*, **441**, 262 (2013)) を用

い、ヒスチジン要求性を指標にしたスクリーニングを行った。ヒスチジン欠損培地上で生育した大腸菌が有する TALE ユニットの遺伝子配列を解析し、5mC 結合 TALE ユニットの候補を得た。これらの候補 TALE タンパク質を大腸菌発現系を用いて精製し、DNA 結合親和性、選択性を、ゲルシフトアッセイで評価した。また、哺乳類細胞でこれらの候補 TALE タンパク質と転写活性化ドメインとの融合体を発現させ、メチル化もしくは非メチル化レポーターベクターを用いて、候補の DNA 結合選択性をルシフェラーゼアッセイで評価した。

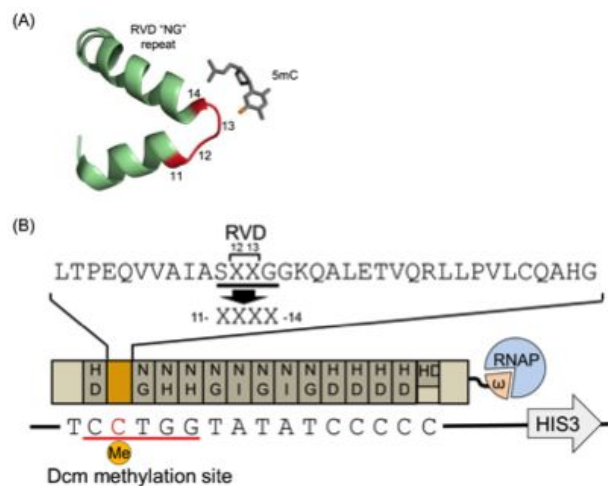


Fig.1 Schematic representation of the bacterial one-hybrid screening for 5mC-specific TALE repeats. (A) DNA recognition mode of a TALE repeat. The structure (PDB: 4GJP) shows an interaction between the RVD "NG" repeat and 5mC. Four amino acid residues (11-14), including RVD, are shown in red. (B) The TALE- ω fusion protein targets the sequence containing Dcm methylated cytosine (red) on the promoter of the HIS3 reporter. The TALE contains 14.5 repeats with RVDs "NG", "HD", "NI", and "NH" for T, C, A, and G recognition, respectively. Target DNA sequences in the reporter vector are aligned to the TALE repeats. Four amino acid residues (11-14) of repeat 2 were randomized and are shown as XXXX.

(2) デザインしたメチル化識別タンパク質を用いた生細胞内でのメチル化検出

メチル化状態依存的な遺伝子機能制御に関する検討および、メチル化状態の簡便な検出法の開発を行った。前者に関しては、(1)で得られたメチル化シトシン選択的 TALE ユニットおよび、メチル化識別能を持たない TALE ユニットを含む DNA 結合ドメインをデザインし、転写活性化ドメインとの融合体を細胞内で発現させ、標的遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量した。標的としては、大腸癌由来の2種の細胞 (HCT116 細胞、SW480 細胞) においてプロモーター領域のメチル化状態が大きく異なっていることが知られている RASSF2 遺伝子を用いた。後者のメチル化状態の簡便な検出法の開発に関しては、単体では活性を持たないが、近接した時にのみ酵素が再構築されて高い活性を示すルシフェラーゼ分割体とメチル化高感受性の TALE とを連結した融合タンパク質を作製した。精製タンパク質および合成オリゴ DNA を用いて、試験管内で系の最適化を行った。また、ゲノム DNA 配列を標的とした TALE を作製し、メチル化 gDNA および、メチル化酵素欠損細胞由来の gDNA に対する検討を行った。さらに、野生型およびメチル化酵素欠損細胞内で融合タンパク質ペアを発現させて、生細胞からの発光量を測定した。

(3) RNA メチル化制御技術の基盤構築

まず、アデノシンのメチル化状態を簡便に判別できる *in vitro* でのメチル化検出法の開発を行った。さらに、RNA 結合タンパク質と RNA メチル化調節酵素との融合体をデザインし、大腸菌発現系から精製した融合体タンパク質の配列特異的メチル化活性を、開発したメチル化検出法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 特定の配列中におけるシトシンのメチル化を選択的に認識できる DNA 結合タンパク質の開発

大腸菌を用いた2段階のスクリーニングを経て、5mC へ高い選択性で結合する TALE ユニットの獲得した。特に、ループ部分にサイズの小さいアミノ酸があることが非メチル化シトシンに対する 5mC 選択性を高めることを示唆する結果を得た。特に、ループ部分に「ASAA」配列を持つ TALE ユニットが高い選択性を持つことがわかった。また、Dcm メチラーゼ認識配列のみならず、哺乳類細胞で見られる CpG メチル化配列中のメチル化シトシンに対しても結合選択性を示した。また、DNA のメチル化含有量の依存した転写活性化能を示すことも確認することができた。一方、得られた TALE ユニットは、標的配列中に複数のメチル化シトシンが含まれる場合、これらの同時認識を達成するには結合力が不十分であった。そのため、塩基認識ループのアミノ酸の数を変えて、更なるスクリーニングを行なったが、より識別能、結合力の高いユニットは得ることはできなかった。様々な配列を標的として、細胞内でのレポーターアッセイおよび、精製タンパク質を用いた物理化学アッセイを行った結果、結合親和性に課題は残すものの、標的配列中に1ヶ所含まれるメチル化シトシンに関しては、天然のユニットと同等の選択性を有するユニットを得ることができたと言える。

(2) デザインしたメチル化識別タンパク質を用いた生細胞内でのメチル化検出

まず、大腸癌由来の2種の細胞 (HCT116 細胞、SW480 細胞) においてプロモーター領域のメチル化状態が異なっていることが知られている RASSF2 遺伝子のメチル化状態をバイサルファイトシーケンス法で確認し、TALE が標的とする領域候補を決定した。メチル化状態依存的な遺伝子機能制御に関して、決定した RASSF2 遺伝子プロモーター領域を標的とする TALE をデザインし、転写活性化ドメインとの融合体発現ベクターを構築した。比較のため、(1)で得られた「ASAA」TALE ユニットおよび、メチル化識別能を持たない「NG」TALE ユニットを含む DNA 結合ドメインをデザインした。これらの融合体タンパク質を細胞内で発現させ、RASSF2 遺伝子発現レベルを測定した。その結果、メチル化識別能を持たない TALE ユニットを含む人工転写因子は、どちらの細胞株においても有意に RASSF2 遺伝子の転写を活性化した。一方、(1)で得られた 5mC 選択的「ASAA」TALE ユニットを含む人工転写因子は、非メチル化細胞 (HCT116 細胞) においては RASSF2 遺伝子の活性化が認められなかったのに対し、標的とする RASSF2 プロモーター領域がメチル化された細胞 (SW480 細胞) においては、有意に転写を活性化した。この結果は、5mC 選択的 TALE ユニットが、生細胞内で標的のメチル化状態を認識して機能していることを示唆している。

また、メチル化感受性の TALE を用いて配列特異的な DNA メチル化状態の簡便な検出法の開発を行った。単体では活性を持たないが、近接した時にのみ酵素が再構築されて高い活性を示すルシフェラーゼ分割体とメチル化感受性の TALE とを連結した融合タンパク質を作製した。まず、大腸菌で発現させて精製した2種類の融合タンパク質を用いて、分割体に連結したそれぞれの TALE が DNA 上の近接した領域に結合した時に、基質存在下、強い発光が生じることを確認し、メチル化の有無を検出できることを確認した。また、ゲノム中の高度にメチル化されている領域を標的として、HCT116 細胞とそのメチル化酵素欠損株から抽出したゲノム DNA で発光量を比較した結果、メチル化感受性の TALE を用いた場合には、ゲノムの標的領域のメチル化状態を区別できることが確認された。さらに、ルシフェラーゼ分割体と TALE の融合タンパク質をこれらの細胞内で発現させ、培地中に基質を加えて発光量を測定した結果、生細胞

においても、この検出系はゲノム中のメチル化状態を区別することが可能であることが示された。

(3) RNA メチル化制御技術の基盤構築

RNA 結合タンパク質と RNA メチル化調節酵素との融合タンパク質によって、RNA 配列選択的に RNA のメチル化状態を調節できることが期待されるが、これまで、これらの酵素の活性を簡便に評価できる方法がなかった。そこで、ACA 配列選択的に作用する大腸菌由来の RNA 切断酵素 MazF の RNA 認識様式に着目した。MazF は ACA 配列を含む一本鎖 RNA を配列選択的に切断することが知られている。一方、本研究では、合成オリゴ RNA を用いたゲル電気泳動により、MazF は 5'側の A を N6-methyladenosine (m6A)に置き換えた(m6A)CA 配列は切断しないことを見出した。この m6A 検出法を利用することにより、配列特異的に RNA に結合する RNA 結合タンパク質とメチル化調節酵素との融合体が標的 RNA 配列選択的な活性を有することを確認することができた。今後、融合タンパク質のデザインを最適化していくための基盤が整った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Shogo Tsuji, Shiroh Futaki and Miki Imanishi, "Sequence-Specific Recognition of Methylated DNA by an Engineered Transcription Activator-Like Effector Protein", Chem. Commun., 52, 14238-14241 (2016)

Miki Imanishi, Shogo Tsuji, Akiyo Suda, Shiroh Futaki, "Detection of N6-Methyladenosine Based on the Methyl-Sensitivity of MazF RNA Endonuclease" Chem. Commun., 53, 12930-12933 (2017)

Kouki Shinoda, Shogo Tsuji, Shiroh Futaki, Miki Imanishi, "Nested PUF Proteins: Extending Target RNA Elements for Gene Regulation", Chembiochem, 19, 171-176 (2018)

Shogo Tsuji, Kouki Shinoda, Shiroh Futaki, Miki Imanishi, "Sequence-specific 5mC Detection in Live Cells Based on the TALE-split Luciferase Complementation System", Analyst, 143, 3793-3797 (2019)

〔学会発表〕(計18件)

今西 未来 「天然にない DNA 認識能を持つ TALE タンパク質の開発」 第 89 回日本生化学会大会 (招待講演) 仙台国際センター、2016 年 09 月 25 日

今西 未来 「メチル化シトシン選択性を有する ゲノム編集ツールの創製」日本薬学会第 137 年会 (招待講演) 東北大学、2017 年 03 月 25 日

辻 将吾、二木 史朗、今西 未来 「新規メチル化シトシン検出法を志向した TALE タンパク質の機能改変」日本薬学会第 137 年会、東北大学、2017 年 03 月 26 日

Kouki Shinoda, Miki Imanishi, Shiroh Futaki, "Extending RNA Sequence Recognition of PUF Proteins toward RNA Sequence-Specific Regulation" RNA2017 The 22nd Annual Meeting of the RNA Society, 2017 年

Miki Imanishi, Akiyo Suda, Shiroh Futaki, "Enzymatic Detection of Activities of m6A RNA Methyltransferases and Demethylases" RNA2017 The 22nd Annual Meeting of the RNA Society, 2017 年

Miki Imanishi, Akiyo Suda, Shiroh Futaki, "Development of a Simple Strategy to Detect Activities of N6-Methyladenosine Regulatory Enzymes", ISBC2017 The International Symposium on Biofunctional Chemistry, 2017 年

Kouki Shinoda, Miki Imanishi, Shiroh Futaki, "Engineering of nested PUF proteins with 16 RNA-binding repeats for regulation of endogenous RNA" ISBC2017 The International Symposium on Biofunctional Chemistry, 2017 年

篠田 昂樹、今西 未来、二木 史朗 「RNA 結合タンパク質 PUF の認識塩基数拡張と内在 RNA の制御」 ConBio2017 生命科学系合同年次大会、2017 年

今西 未来、篠田 昂樹、辻 将吾、二木 史朗 「配列選択的 RNA 結合蛋白質 PUF の結合領域の

拡張と遺伝子発現制御」第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年

Miki Imanishi, “Engineering of Nucleic Acid Binding Proteins toward Manipulation of Gene Expression” 日中若手女性研究者会議（招待講演）2017 年

今西 未来 「遺伝子発現を制御する人工タンパク質の創製」日本化学会第 98 春季年会（招待講演）2018 年

今西 未来、須田 明代、二木 史朗 「エンドリボヌクラーゼ MazF を用いた N6-メチルアデノシン調節酵素活性の検出法の開発」第 65 回日本生化学会近畿支部例会、兵庫医科大学、2018 年

今西 未来 “Design of Nucleic Acid Binding Proteins to Control Cellular Events” 熊本大学発酵研リエゾンラボ研究会（招待講演）2018 年

Miki Imanishi, “Artificial DNA/RNA Binding Proteins Regulating Specific Gene Expression” The Fifth Asian Chemical Biology Conference（招待講演）, X'ian (China) 2018 年

Miki Imanishi, Akiyo Suda, Shiroh Futaki, “Detection of the m6A-Regulatory-Enzymes Activities Using an Endoribonuclease, MazF”, RNA2018, Berkeley (USA) 2018 年

今西 未来 「核酸修飾を標的とした遺伝子操作」2018 年度 先端分析・機能創発研究会、早稲田大学、2018 年

今西 未来、須田 明代、二木 史朗 「RNA 切断酵素 MazF を用いた N6-メチルアデノシン調節酵素活性検出法の開発」日本ケミカルバイオロジー学会 第 13 回年会、東京医科歯科大学、2018 年

Kouki Shinoda, Miki Imanishi, Shiroh Futaki, “Site-Specific Regulation of RNA Demethylation Based on Sequence-specific RNA Binding Proteins” 10th International Peptide Symposium/第 55 回ペプチド討論会、京都、2018 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

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、研究者個人に帰属されます。