

令和元年5月30日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08082

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ胚で可視化されるトランスジーンサイレンシングに関する研究

研究課題名(英文) Mechanism of transgene silencing that is visualized in zebrafish embryos

研究代表者

下田 修義 (SHIMODA, Nobuyoshi)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・室長

研究者番号：90416173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生き物には外来からのDNA(遺伝子)を異物として認識し不活性化しようとする機能がある。私はゼブラフィッシュのゲノムに緑色蛍光遺伝子を含むDNAを導入したときに、その現象に遭遇した。具体的には受精後まもなくは観察された緑色蛍光が胚発生の段階で徐々に消失し、それに伴いその遺伝子のDNAがメチル化により修飾を受けるという現象を発見した。そのDNAメチルを担う酵素を見つける試みは未だ成功していないが、外来遺伝子の認識に関わるPARP12bという遺伝子がこの不活性化に関与することを見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来遺伝子をDNAメチル化により不活性化することをジーンサイレンシングと呼ぶ。ジーンサイレンシングは生体防御反応の一つであると考えられているが、生物学において組換え遺伝子生物を作製しようとするときに、あるいは遺伝子治療を試みるときに、その現象は障害となる。そこでそのメカニズムを明らかにし、ジーンサイレンシングをコントロールできるようになることが望まれる。本研究ではその第一歩として、ジーンサイレンシングに關与する遺伝子PARP12bを見つけることができた。

研究成果の概要(英文)：Living organisms have a function to recognize foreign DNA (gene) and inactivate it. I encountered the phenomenon when I generated a transgenic zebrafish that possessed the green fluorescent (GFP) gene. The fluorescence can be visualized in the embryos during two days after fertilization. However, it becomes extinct after four days. I found that the GFP gene was concomitantly modified by methylation with the extinction. I revealed that a gene named PARP12b, which is reported to be involved in the recognition of foreign DNA, was involved in the silencing of the GFP gene, although I still could not find the gene responsible for the methylation.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：DNAメチル化 ジーンサイレンシング エビジェネティクス ゼブラフィッシュ

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

1. 研究開始当初の背景

植物・動物のゲノムに挿入された遺伝子はしばしば発現抑制を受け研究遂行の障害となる。たとえば哺乳動物の培養細胞やゼブラフィッシュのゲノムにDNAを導入し目的の遺伝子の発現を期待しても、遺伝子発現が見られない、あるいは当初発現したものの継代につれて発現が弱まり、ついには発現が消失することがある。その場合トランスジーンにはDNAメチル化が見られ、これはトランスジーンサイレンシングとよばれる外来核酸に対する生体防御機構の結果とみなされている。植物細胞ではトランスジーンサイレンシングの理解が進んでおり、外来RNAの破壊と、その分解物であるsiRNAがRNAの出所となったDNAをメチル化し発現を抑制するという2段階構えとなっているのが明らかにされている。一方、動物の体細胞でのトランスジーンサイレンシングはエピジェネティクスによるゲノム防御機構のなかでももっとも理解が遅れた現象のひとつであり、また、効率のよいトランスジェニック動物作製法の開発、あるいは遺伝子治療のためにもその解明は重要な研究対象であるが、動物でのトランスジーンサイレンシングは確率的に生じ、さらにいったん生じたサイレンシングは世代を超えて固定されるため、その発動メカニズムはほとんど明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

動物の細胞に遺伝子を導入するとしばしばトランスジーンサイレンシングと呼ばれる DNAメチル化を伴う発現抑制が生じる。この現象は動物細胞のゲノム防御機構の一つと考えられている。トランスジーンサイレンシングは偶発的に生じ、一旦起こると世代を超えて維持されるため、その発動機序を解くための良い系が存在しなかった。私は偶然、トランスジーンサイレンシングが再現性よく、胚発生時の特定期間だけ解除され強い蛍光を発する GFP トランスジェニックゼブラフィッシュ系統を見出した。またそのトランスジーンサイレンシングの再開時に先立ち de novo メチル化がトランスジーンに生じることを発見した。そこで本研究ではこの魚を利用して、その発動・解除に關与する遺伝子を同定し、トランスジーンサイレンシングのメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) トランスジーンサイレンシングによるゼブラフィッシュ胚での GFP 消失に先立ち GFP 遺伝子の DNA de novo メチル化が徐々に進行する。de novo メチル化酵素遺伝子はこのトランスジーンサイレンシングに關与することが明らかで唯一の因子であるため、このメチル化酵素遺伝子の探索から研究をスタートした。ゼブラフィッシュにおける de novo 型の DNAメチル化酵素については、dnmt3,4,5,6,7,8 の6種類が存在する。そこで CRISPR/CAS9 遺伝子編集技術を活用して、それらの de novo メチル化酵素遺伝子のうち dnmt3(dnmt3bb.2)と dnmt8 (dnmt3aa)の変異体を作製したのち、トランスジーンサイレンシングの生じる GFP line と掛け合わせ(以下、“TG”と表す) GFP の蛍光と DNA メチル化を指標にしてトランスジーンサイレンシングにかかわる de novo メチル化酵素遺伝子の同定を試みた。

(2) また本研究期間中の2017年に、哺乳動物の ZAP (zinc-finger antiviral protein) と呼ばれるタンパク質が、CpG ジヌクレオチドに富んだ非自己の RNA に結合し、その非自己 RNA の働きを抑制することが示された。今回私が作製したトランスジーンサイレンシングの生じる GFP line のトランスジーンは CpG ジヌクレオチドを豊富に含んでおり、DNA メチル化による転写の阻害のみならず、転写後に転写産物の ZAP によるサイレンシングの可能性も考えられた。そこで ZAP の翻訳阻害を起こすアンチセンスモルフォリノを受精卵に注入し、GFP 傾向の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュには哺乳動物の dnmt3a のホモログ dnmt6 と dnmt8、哺乳動物の dnmt3b のホモログ dnmt3, 4, 5, 7 が存在する。ゼブラフィッシュのどのホモログが哺乳動物の dnmt3a, b のオソログであるかは不明である。そのため私はまず dnmt3 を CRISPR/CAS9 遺伝子編集技術でその第6エキソンを破壊した。3つの独立した変異が得られたが、8bp の欠損を持つ変異体を本研究で使用した。この変異体胚には初期胚で血管異常が一過的に見られたものの、回復し、生殖能力を持つ成魚に成長した。そこでホモ変異体の雄雌同士を掛け合わせ、その二日胚で全ゲノムバイサルファイトシーケンスによりメチローム解析を行ったところ多数のメチル化差異領域が検出されたことから、dnmt3 遺伝子の機能を各変異体であることを確認した。同ホモ変異体と上記 GFP line を掛け合わせ、dnmt3^{+/-}; TG⁺ のヘテロ個体を作製し、さらにそのダブルヘテロ個体同士を掛け合わせることににより、dnmt3^{-/-}; TG⁺ or TG/TG 個体を作製し、Dnmt3 非存在下での GFP の蛍光観察をしたが変化は見られなかった。そこで次に共同研究者より dnmt8(哺乳類の dnmt3a ホモログ)の変異体入手し、単独、さらには dnmt3 との二重変異体における GFP の蛍光観察をしたがトランスジーンサイレンシングは正常に観察された。また維持メチル化酵素遺伝子 dnmt1 の機能低下型変異体(機能喪失型は致死)も入手し、TG と掛け合わせ、dnmt1^{-/-}胚での GFP を観察したが、やはり TG には変化は見られなかった。そのため TG に關与する de novo メチル化酵素遺伝子は残りの、dnmt4, 5, 6, 7 のいずれか、あるいは dnmt3~8 のうちの複数(リダンダント)であると推測している。そこで現在、変異体が致死との報告のある dnmt4 を除く dnmt5, 6, 7 についても変異体を作製中であ

る。

(2) トランスジーンサイレンシングについては転写を抑える仕組みと、siRNA のように転写産物の機能を失わせる仕組みの二つが存在する。本研究課題を実施中に、哺乳動物細胞では CpG リッチなウイルスの mRNA には ZAP と呼ばれるタンパク質が細胞質でウイルスの mRNA に結合し、それが RNA エキソソームにより分解されることで、核内でのウイルスの複製を抑制するとの報告があった。今回の TG では GFP 遺伝子と連結したバクテリアのメチル化酵素遺伝子 MSsI には CpG ジヌクレオチドがリッチに存在するため、その mRNA はゼブラフィッシュにおいて ZAP あるいはその類似タンパクの標的になるのではないかと推測された。ゼブラフィッシュには ZAP としてアノテーションされた遺伝子は存在しないため、その類縁と見なせる zPARP12, zPARP12a, zPARP12b に対するアンチセンスモルフォリノオリゴを合成し、TG 胚に顕微注入した。その結果、zPARP12b の機能阻害において、GFP シグナルの明確な上昇が認められた。したがって本研究により、ウイルスだけでなくトランスジーンも塩基配列によっては ZAP あるいはその類似タンパクの標的となりサイレンシングを受ける可能性が示された。

5. 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。