

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20888

研究課題名（和文）がんエピゲノム変異誘導マウス作製技術の開発

研究課題名（英文）Development of an epigenome-editing technology for inducing cancer epimutations in mice

研究代表者

伊関 大敬（ISEKI, Hiroyoshi）

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号：50433652

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：エピゲノムの異常は発がんに寄与すると考えられているが個体レベルで検証するためのエピゲノム編集技術が確立されていない。そこで本研究では、CRISPR/Cas9ゲノム編集システム及びエピゲノム酵素足場を組み合わせたエピゲノム編集技術の開発を試みた。本研究結果として、N末端側約700アミノ酸を欠損した機能的縮小化dCas9タンパク質を作製した。また、Jarid2等のエピゲノム酵素足場タンパク質をdCas9に融合した新規エピゲノム編集システムを開発した。さらに、ガイドRNAへ付加可能な約150塩基のエピゲノム酵素足場長鎖非翻訳RNAを同定した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop an epigenome-editing technology by applying a CRISPR/Cas9 system and epigenome-modifying enzyme-scaffold proteins and lncRNAs. We first generated a functional small dCas9 mutant by deleting the N-terminal half of the dCas9 protein. Next, we developed an epigenome-editing system with epigenome-modifying enzyme-scaffold proteins. We also identified a candidate epigenome-modifying enzyme-scaffold lncRNA.

研究分野：発生工学、実験動物学

キーワード：エピゲノム編集 CRISPR/Cas9 lncRNA

1. 研究開始当初の背景

がんや肥満、糖尿病、精神疾患などでは、特定領域のエピゲノム(ゲノム DNA のメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化等)に異常が見られ、エピゲノム異常と疾患との関連性が示唆されている。

がんのエピゲノム研究においては、正常細胞(正常組織)及びがん細胞(がん組織)との比較から大腸癌や胃癌など様々なヒトがんに DNA メチル化異常の存在が確認されている。がん DNA メチル化異常は多くの場合、がん抑制遺伝子の発現制御領域に見られ、その発現抑制が発がんに寄与すると考えられている。しかし、ヒトがん検体及びがん細胞株におけるエピゲノム異常を明らかにした報告は多数あるものの、動物個体にエピゲノム異常を導入し、がんの発症或いは進展に関与するか否かを直接的に検証した報告は無い。

一方、ゲノム変異によるがん抑制遺伝子の不活化と発がんとの関連性においては、動物個体で多数実証されており、ゲノム変異ががんの原因となることが明確に示されている。このような個体レベルのエピゲノム研究の遅れは技術的な問題が大きい。近年のゲノム編集技術(任意のゲノム DNA 配列を除去あるいは導入する技術)は CRISPR/Cas9 の応用により格段に進歩し、培養細胞及び動物個体においてゲノムの改変が容易に出来るようになってきている。しかし、任意のエピゲノムを変換可能なエピゲノム編集技術は、細胞レベルでは報告されているが、個体レベルでの報告は無く、また、いずれの報告においても効率良く安定的にエピゲノムを誘導できる技術には至っていない(Konermann et al, Nature 2013, Mendenhall et al, Nat. Biotechnol. 2013, Maeder et al, Nat. Biotechnol. 2013)。従って、動物個体内でがん DNA メチル化異常と発がんとの関連性を実証するには、新規のエピゲノム編集技術の開発が必須である。

2. 研究の目的

本研究では個体レベルで標的配列のエピゲノム編集を可能にする技術を開発することを第一の目的とした。また、構築した技術を用いてがんエピゲノム異常誘導マウスを作出し、特定のエピゲノム異常と発がんとの関連性を明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

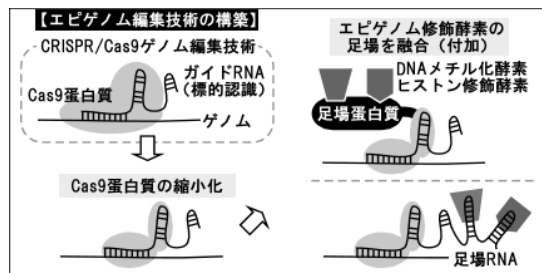
新規エピゲノム編集技術の構築:

ZNF や TALE 等の DNA 結合ドメインを用いた研究により、エピゲノム修飾酵素(DNA メチル化酵素やヒストン修飾酵素)またはそれらの酵素活性ドメインを任意のゲノム領域に局在させれば、人為的にエピゲノムを編集可

能であることが示唆されている。

CRISPR/Cas9 システムは、Cas9 タンパク質とガイド RNA の 2 つの要素で構成された新規ゲノム編集技術である。Cas9 タンパク質はガイド RNA を取り込むことでゲノムに結合し、ガイド RNA 配列依存的に特定配列を認識、局在する。CRISPR/Cas9 は簡便にベクターの設計・構築ができるため、近年のゲノム編集技術の主流となっている。

本研究では、Cas9 タンパク質及びガイド RNA の改良により新規エピゲノム編集技術の開発を行った。特にエピゲノム酵素の足場に着目し、Cas9 タンパク質及びガイド RNA それぞれにエピゲノム修飾酵素の足場を付加した発現ベクターを構築した。

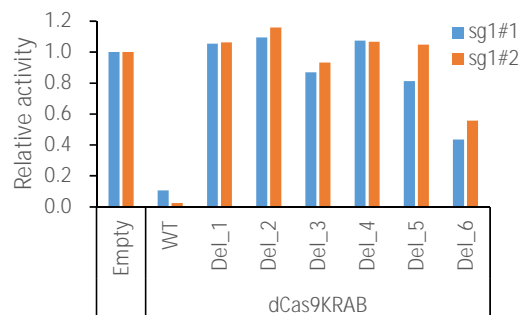


4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を応用したエピゲノム編集技術の構築

Cas9 タンパク質の縮小化

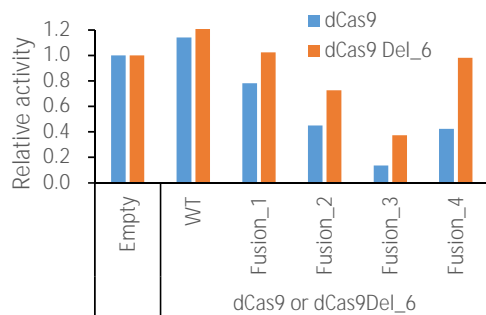
Cas9 は 1,368 アミノ酸から成る非常に大きなタンパク質のため、足場融合タンパク質の発現や機能に制限をきたす可能性が高い。そこで 6 種の N 末端欠損 dCas9-KRAB 変異体(DeL1~6)を作製し、ガイド RNA 及びゲノムに結合可能な縮小化 Cas9 の同定を行った。ガイド RNA は *Nanog* プロモーターを標的とし、配列が異なる 2 種類のガイド RNA (sg1#1 及び sg1#2) を用いた。評価系として、*Nanog* プロモーター依存的ルシフェラーゼ発現ベクター(*Nanog-luc*)を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。dCas9-KRAB (DNA 切断活性欠損 Cas9 と転写抑制ドメイン KRAB 融合タンパク質)をガイド RNA 及び *Nanog-luc* と共にマウス ES 細胞に導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定したところ、90%以上の抑制効果が得られた。この条件下で N 末端欠損変異体の抑制効果を検討した結果、約 700 アミノ酸欠損変異体 DeL6 は 40-50%の抑制効果を示し、機能的であることが明らかとなった。



完全長 (WT) dCas9-KRAB に比べ抑制効果は低下しており効率面で改善の余地はあるものの、本実験によって、約半分以下のサイズに縮小した機能的 dCas9 を同定することができた。

エピゲノム修飾酵素足場タンパク質融合によるエピゲノム編集の検討

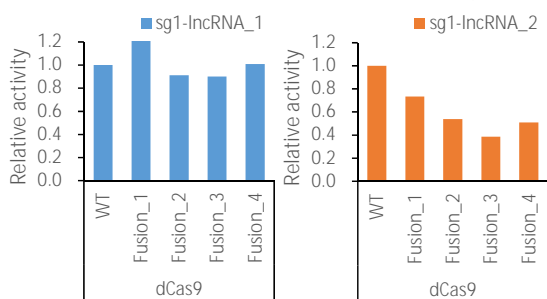
次に、WT dCas9 及び上記縮小化 dCas9 に DNA メチル化酵素及びヒストン修飾酵素の足場タンパク質・ドメインを融合し、ガイド RNA との共発現により Nanog-luc 活性を抑制し得るか検討した。4 種の足場ドメイン融合 dCas9 及び縮小化 dCas9 タンパク質 (dCas9 Fusion_1~4 及び dCas9 Del_6 Fusion_1~4) を作製し ES 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、3 種の dCas9 融合タンパク質及び 1 種の縮小化 dCas9 融合タンパク質で 50%以上の抑制効果が得られた。このうち Fusion_4 は Jarid2 タンパク質 N 末端の融合タンパク質であり、本研究で初めて、dCas9 との融合により標的プロモーターの転写抑制に寄与することが明らかとなった。Jarid2 は転写抑制因子 PRC2 複合体の足場タンパク質として知られており、これら複合体をリクルートすることでヒストン H3K27 のメチル化を介して発現抑制に働いたと推測される。



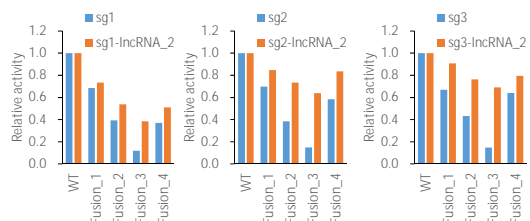
エピゲノム修飾酵素足場 RNA 付加ガイド RNA によるエピゲノム編集の検討

ガイド RNA に DNA メチル化酵素またはヒストン修飾酵素の足場 RNA を融合し、dCas9 または縮小化 dCas9 との共発現により Nanog-luc 活性を抑制し得るか検討した。エピゲノム修飾酵素の足場として 2 種類の長鎖非コード RNA (IncRNA_1 及び 2) をガイド RNA の 3' に付加しルシフェラーゼアッセイを行った。しかし、いずれの組み合わせにおいても、IncRNA の効果は限定的であり弱い抑制しか得られなかった。そこで次に、上記の融合タンパク質 4 種とそれぞれ共発現させ協調的作用があるか否か検討した。その結果、ガイド RNA 3' への IncRNA_1 の付加は dCas9 足場ドメイン融合タンパク質の転写抑制活性を阻害することが明らかとなった。一方、IncRNA_2 の付加では dCas9 足場ドメイン融合タンパク質の抑制効果は維持されていた。ただし、IncRNA_2 付加ガイド RNA の場合も通常のガイド RNA に比べ dCas9 融合タンパク質の抑制効果が低下した。今回使用した IncRNA_1

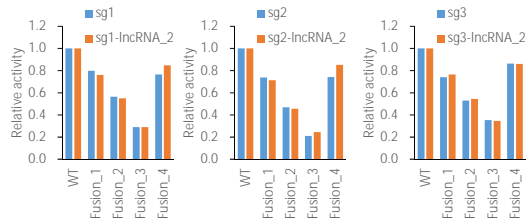
は約 90 塩基、IncRNA_2 は約 150 塩基のエピゲノム修飾酵素結合配列であり付加した配列の長さが問題では無いと考えられる。



一つの可能性として構造上の問題が考えられたため、IncRNA_2 を付加する位置を変更し、同様にルシフェラーゼアッセイを行った。IncRNA_2 を付加する位置として、ガイド RNA の tetraloop (sg2) 及び stem loop (sg3) を検討した。dCas9 融合タンパク質と共導入しその活性を測定した結果、いずれの位置への付加でも IncRNA_2 が阻害的であることが明らかとなった。3' 挿入ガイド RNA (sg1) との比較では、sg1-IncRNA が最も転写抑制活性を保持しており、3' への付加が最も良いと考えられる。



同様に、縮小化 dCas9 融合タンパク質と IncRNA_2 付加ガイド RNA (sg1-IncRNA_2、sg2-IncRNA_2、sg3-IncRNA_2) との組み合わせでルシフェラーゼアッセイを行った。興味深いことに、いずれの位置へ IncRNA_2 を付加しても縮小化 dCas9 足場ドメイン融合タンパク質の抑制効果を阻害しないことが明らかとなった。このことから、IncRNA_2 が dCas9 タンパク質 N 末端に干渉し転写抑制を阻害していた可能性が示唆された。



以上の結果は、N 末端欠損 dCas9 Del_6 は IncRNA 付加ガイド RNA との組み合わせに適していることを示唆している。

今後は縮小化 dCas9 融合タンパク質及び IncRNA 付加ガイド RNA により、安定的なエピゲノムの修飾が可能か否か明らかにし、個体レベルでエピゲノム編集が可能な最良のシステムを構築する予定である。

(2) マウス個体におけるエピゲノム編集技術の検証

培養細胞にて有用なエピゲノム編集技術(足場融合 Cas9・ガイド RNA)の確立まで至らなかったため、2 つ目の目的である個体レベルのエピゲノム編集の検証は達成できなかった。今後の課題として上記の縮小化 dCas9 融合タンパク質を用いて検討していきたい。

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3件)

Al-Soudy AS, Nakanishi T, Mizuno S, Hasegawa Y, Shawki HH, Katoh MC, Basha WA, Ibrahim AE, El-Shemy HA, Iseki H, Yoshiki A, Hiromori Y, Nagase H, Takahashi S, Oishi H, Sugiyama F. Germline recombination in a novel Cre transgenic line, Pr13b1-Cre mouse. Genesis 54(7):389-397(2016) 査読有 DOI: 10.1002/dvg.22944

Hasegawa Y, Hoshino Y, Ibrahim AE, Kato K, Daitoku Y, Tanimoto Y, Ikeda Y, Oishi H, Takahashi S, Yoshiki A, Yagami K, Iseki H, Mizuno S, Sugiyama F. Generation of CRISPR/Cas9-mediated bicistronic knock-in ins1-cre driver mice. Exp. Anim. 65(3):319-327(2016) 査読有 DOI: 10.1538/expanim.16-0016

Iseki H, Nakachi Y, Hishida T, Yamashita-Sugahara Y, Hirasaki M, Ueda A, Tanimoto Y, Iijima S, Sugiyama F, Yagami KI, Takahashi S, Okuda A, Okazaki Y. Combined overexpression of JARID2, PRDM14, ESRRB, and SALL4A dramatically improves efficiency and kinetics of reprogramming to induced pluripotent stem cells. Stem Cells 34(2):322-333(2016) 査読有 DOI: 10.1002/stem.2243

[学会発表](計2件)

伊関大敬、今野裕士、奥泉久人、高橋智、八神健一、杉山文博
ゲノムワイド DNA メチル化解析によるラットパルボウイルス感染抵抗性の原因遺伝子の同定
第 39 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)」
2016 年 11 月 30 日

伊関大敬、仲地豊、菱田友昭、菅原泉、谷本陽子、飯島沙織、杉山文博、八神健

一、高橋智、奥田晶彦、岡崎 康司
Jarid2 過剰発現による効率的な iPS 細胞誘導
第 62 回日本実験動物学会総会
「京都テルサ(京都府京都市)」
2015 年 5 月 28 日

[その他]

ホームページ等

<http://wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/japanese/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊関 大敬 (ISEKI Hiroyoshi)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・助教

研究者番号: 50433652