

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06185

研究課題名(和文)造血におけるゼブラフィッシュDnmt3aa標的ゲノム領域と領域特異化因子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of zebrafish Dnmt3aa target genomic regions and region-specific factors in hematopoiesis

研究代表者

菊池 裕 (Kikuchi, Yutaka)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授

研究者番号：20286438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物におけるプロモーターのDNAメチル化は、遺伝子発現制御に機能する事が報告されている。しかし、転写終結領域におけるDNAメチル化の役割に関しては、未だ報告されていない。本研究では、哺乳類新規DNAメチル基転移酵素Dnmt3aの相同遺伝子であるゼブラフィッシュdnmt3aa遺伝子の母性胚性ノックアウト変異体(MZdnmt3aa-/-)を作製し、転写終結過程におけるDnmt3aaの機能解明を研究目的とした。MZdnmt3aa-/-胚を用いたRNA-seq解析・全ゲノムバイサルファイトシーケンシング解析等により、転写終結領域におけるDNA低メチル化は、転写終結制御に関与している事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物におけるプロモーターのDNAメチル化は、遺伝子発現制御に機能する事が報告されているが、転写終結領域におけるDNAメチル化の役割に関しては、未だ報告はなされていない。本研究課題では、世界で初めて転写終結領域におけるDNA低メチル化が、転写終結制御に関与している事を見出した。DNAのメチル化制御は、癌の悪性化にも関している事が知られているため、本研究成果は癌治療にも役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The de novo DNA methyltransferase Dnmt3a regulates gene expression through methylation modification of genomic DNA. DNA methylation of promoters in vertebrates has been reported to function in the regulation of gene expression. However, the role of DNA methylation in the transcription termination region has not yet been reported. In this study, we generated a maternal embryonic knockout mutant (MZdnmt3aa-/-) of the zebrafish dnmt3aa gene, which is a homologue of the mammalian Dnmt3a gene, to elucidate the function of Dnmt3a in the transcription termination process. We found that DNA hypomethylation in the transcription termination region is involved in the regulation of transcription termination by comprehensive gene expression analysis and whole genome bisulfite sequencing analysis using MZdnmt3aa-/- embryos.

研究分野：情報生物学

キーワード：転写終結 Dnmt3a ゼブラフィッシュ

< 1. 研究開始当初の背景 >

ゲノム DNA のメチル化は、主に遺伝子発現制御を介して、発生・iPS 細胞作製等における細胞分化・初期化や癌化等の疾患への関与が報告されている。この様なメチル化修飾は、DNA メチル基転移酵素 (DNA methyltransferase; Dnmt) により行われ、哺乳類には Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b の 3 種類が知られている。この 3 種の酵素は、DNA 複製に伴うメチル化パターンの維持に働く Dnmt1 (維持メチル化酵素) と新規メチル化パターンの形成に機能する Dnmt3a, Dnmt3b (*de novo* メチル化酵素) に分類する事が出来る。マウス発生過程では、受精後から着床前においてゲノム DNA が一旦脱メチル化されるが、着床後は Dnmt3a 及び Dnmt3b が、それぞれ独自の標的配列をゲノムワイドで再メチル化する。したがってマウスにおいて *de novo* メチル基転移酵素の機能喪失は、様々な領域でのメチル化低下と、その直接的・間接的影響による多数の遺伝子発現の変動を引き起こし、ノックアウトマウスは致死となる。このことは次の二つの解析を困難にしている。一つは、メチル化により組織特異的発現が直接コントロールされる遺伝子の同定である。マウス Dnmt3a がコントロールする遺伝子には急性骨髄性白血病の責任遺伝子が含まれると予想されるが、その発見に至らない原因はおそらくここにある。もう一つはメチル化の標的配列決定機構の解明で、これはメチル化により直接コントロールされる遺伝子の同定が解析の前提条件となる。そこで本研究課題では、ゼブラフィッシュの安定でシンプルな DNA メチル化様式を利用して、「メチル化により組織特異的発現が直接コントロールされる遺伝子は存在するのか?」・「その遺伝子はどのようにしてメチル化の標的となるのか?」というエピジェネティクスにおける根本的かつ永年の謎を問う。

特に本研究において私達は、DNA メチル化の関与が知られている転写制御に着目した。脊椎動物におけるプロモーター及び遺伝子内 (Gene Body) の DNA メチル化は、転写開始及び転写伸長・スプライシングに関与し、発生過程の細胞分化や癌化における遺伝子発現制御に機能する事が報告されている。しかしながら、転写終結領域における DNA メチル化の役割に関しては、未だ報告はなされていない。本研究課題では、ゼブラフィッシュ DNA メチル基転移酵素遺伝子 *Dnmt3aa* 欠損変異体を用いて、転写終結における DNA メチル化の機能を明らかにする事を目標とする。

< 2. 研究の目的 >

de novo DNA メチル基転移酵素 Dnmt3a は、ゲノム DNA のメチル化修飾を介して遺伝子発現を制御している。私達は、哺乳類 Dnmt3a の相同遺伝子であるゼブラフィッシュ *dnmt3aa* 遺伝子の母性胚性ノックアウト変異体 (*MZdnmt3aa^{-/-}*) を作製した結果、血管芽細胞 (血液と血管内皮細胞の共通の前駆体細胞) は形成されるが、血管内皮細胞の低形成・血液細胞 (一次・二次造血) の大幅な減少が観察された。更に私達は、*MZdnmt3aa^{-/-}* 変異体を詳細に解析した結果、転写終結領域の DNA 低メチル化と転写終結異常 (読み通り転写: read-through) の間に正の相関関係がある可能性を見出した。本研究課題では、*MZdnmt3aa^{-/-}* 胚を用いた網羅的遺伝子発現解析 (RNA-Seq) ・ Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) 解析 ・ 情報生物学的解析等により、直接の標的であるゲノム領域を明らかにし、造血過程及び転写終結過程における Dnmt3aa の機能解明を研究目的としている。

< 3. 研究の方法 >

- (1) Dnmt3aa による造血異常を解析するため、*MZdnmt3aa^{-/-}* 胚を用いて、一次造血マーカー (*tal1*, *lmo2*, *mpx*) と二次造血マーカー (*cmyb*) 遺伝子の発現解析を詳細に行い、異常になっている造血過程を明らかにする。
- (2) 受精後 2 日目の *MZdnmt3aa^{-/-}* 胚を用いて WGBS 解析を行い、ゲノムにおける Differentially Methylated Region (DMR) の位置 (転写開始点 TSS ・ 遺伝子内領域 ・ 転写終結点 TTS ・ 遺伝子間領域) を特定する。
- (3) 受精後 2 日 *MZdnmt3aa^{-/-}* 胚から RNA を抽出し、RNA-seq 解析及び qRT-PCR 解析により、転写終結異常を明らかにする。

< 4. 研究成果 >

(1) MZdnmt3aa^{-/-}胚における造血の解析

CRISPR-Cas9法により、ゼブラフィッシュ*dnmt3aa*のノックアウト変異体 (MZdnmt3aa^{-/-}) の作製を行った (図1)。MZdnmt3aa^{-/-}変異体の造血に関しては、一部の胚では全く血液が観察されず、更に次世代に受け継がれている可能性が見出された。このような現象はエピ変異である可能性が考えられるため、造血関連遺伝子のエピジェネティックな変化に関して、現在継続して解析を行っている段階である。

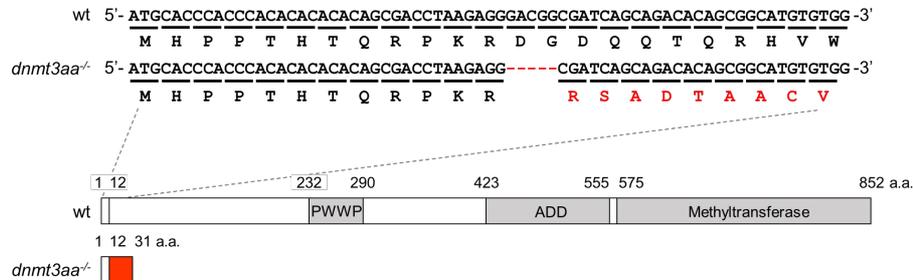


図1 MZdnmt3aa^{-/-}変異体の作製と表現型

CRISPR-Cas9法により5 bpの欠失が起り、13番目のアミノ酸からフレームがずれたアミノ酸 (赤い領域) と終始コドンを生じる。

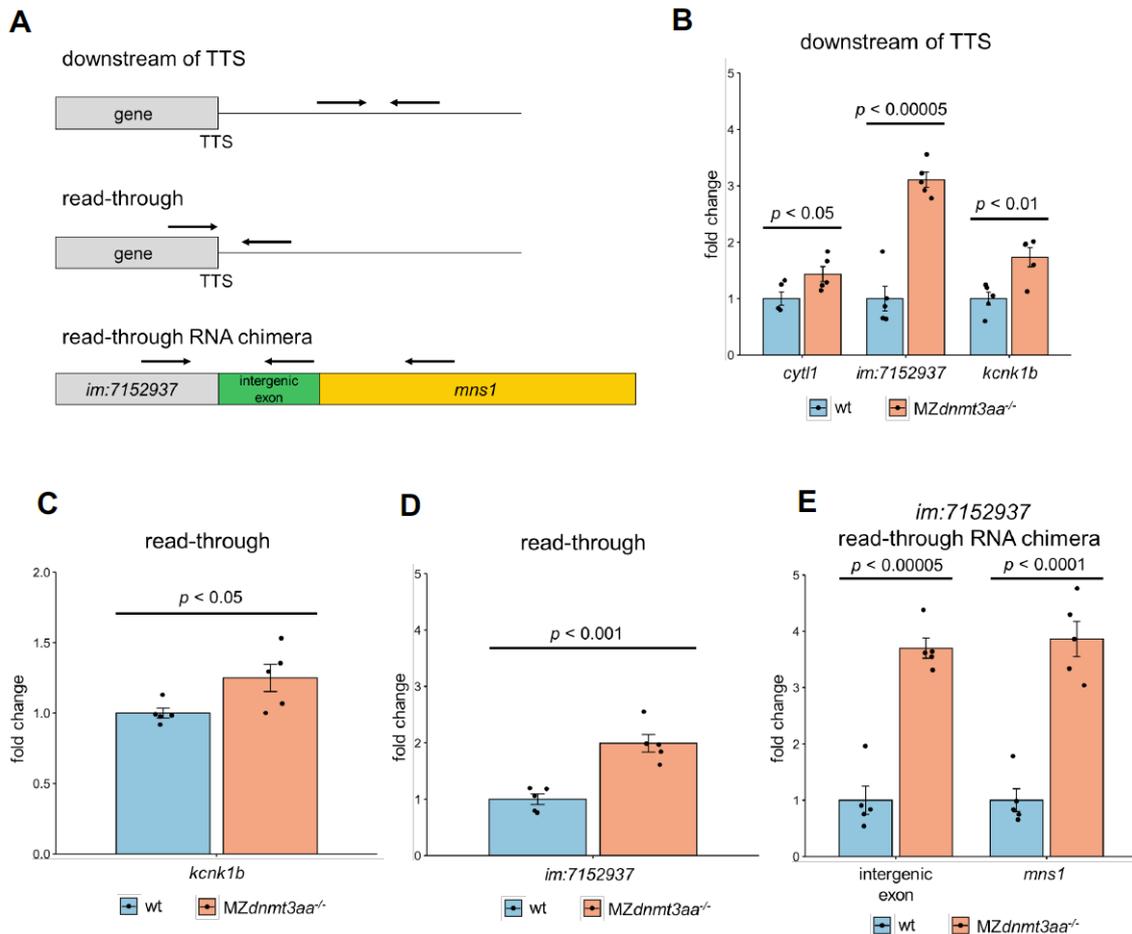


図2 MZdnmt3aa^{-/-}胚変異体における転写終結異常

(A) TTS 下流の転写産物、読み通り転写産物、キメラ転写産物を検出するためのプライマー設計部位。(B, C, D) TTS 下流の転写産物の発現量解析 (B)、*kcnk1b* 遺伝子における読み通り転写産物の発現量解析 (C)、*im7152937* 遺伝子における読み通り転写産物の発現量解析 (D)、(E) *im7152937* 遺伝子におけるキメラ転写産物の発現量解析

(2) Dnmt3aa によりメチル化制御されるゲノム DNA 領域の特定

WGBS 解析により、全ゲノムにおけるメチル化解析を行った結果、MZdnmt3aa^{-/-}変異体において、DNA メチル化が野生体と比較して有意に減少したゲノム領域 DMR は 4032 ヶ所であり、遺伝子内領域には 2350 ヶ所ある事が明らかになった。更に、MZdnmt3aa^{-/-}変異体の RNA-seq 解析を行い、発現している遺伝子に関して調べた結果、転写開始点 TSS を含む DMR (60 ヶ所)、転写終結点 TTS を含む DMR (27 ヶ所) に分類された。

(3) qRT-PCR による転写終結異常の検出

野生体と比較して MZdnmt3aa^{-/-}変異体特異的に TTS のメチル化が減少した 3 つの遺伝子 (*cytokine like 1 (cytl1)*, *im:7152037*, *potassium channel, subfamily K, member 1b (kcnk1b)*) に関して qRT-PCR 解析を行った結果、全ての遺伝子で TTS 下流の遺伝子発現が増加している事が明らかになった (図 2 A, B)。また、*kcnk1b*, *im:7152037* 遺伝子は、読み通り転写を起こしている事、更に *im:7152037* 遺伝子に関しては、TTS を超えた転写産物と下流遺伝子のエキソンとのキメラ転写産物が有意に増加していた事を見出した (図 2 A, C-E)。以上の結果は、転写終結領域における DNA 低メチル化により読み通り転写が起こっている事を示しており、世界で初めて転写終結異常を検出することに成功した。同様に、情報生物学的解析により、Dnmt3a のノックアウトマウス神経細胞においても、読み通り転写が起こっている事を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi, H., Yumoto, K., Yasuhara, K., Enrico T. Nadres, T.E., Kikuchi, Y., Taichman, R.S., and Kuroda, K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Anticancer polymers designed for killing dormant prostate cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1096-1106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53859-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hozumi, S., Shirai, M., Wang, J., Aoki, S., and Kikuchi, Y.	4. 巻 502
2. 論文標題 The N-terminal domain of Gastrulation brain homeobox 2 (Gbx2) is required for iridophore specification in zebrafish.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 104-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.05.128.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takayama, K., Muto, A., and Kikuchi, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Leucine/glutamine and v-ATPase/lysosomal acidification via mTORC1 activation are required for position-dependent regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-26664-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fukuzawa, T. and Kikuchi, Y.	4. 巻 54
2. 論文標題 Unusual light-reflecting pigment cells appear in the Xenopus neural tube culture system in the presence of guanosine.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 55-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2018.08.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 治子、山本 泰久、雲山 一慧、池田 皓、Mingcong Xu、菊池 裕
2. 発表標題 哺乳類における運動器の筋 腱接合部の形成と成熟機構の統合的理解
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井 均樹、奈良 拓也、高橋 治子、Chen Yuan、高山 和也、廣瀬 湧大、栗津 暁紀、藤井 雅史、下田 修義、菊池 裕
2. 発表標題 転写終結は、Dnmt3aによる転写終結部位のDNAメチル化レベルと関連がある
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 治子、菊池 裕
2. 発表標題 3次元 in vitro培養系によるがん微小環境理解のための組織構成的アプローチ
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井 均樹、高橋 治子、高山 和也、下田 修義、菊池 裕
2. 発表標題 ゼブラフィッシュDnmt3aaが標的とするゲノム領域の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jie Huang, Haruko Takahashi, Mayuko Nishi, Akihide Ryo, Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Comprehensive analysis of miRNAs in cancer stem-like cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohamed N. Bakr, Shunya Hozumi, Hiroya Katayama, Haruko Takahashi, Yukinari Haraoka, Tohru Ishitani, Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Tumor invasion and progression are associated with cholinergic-nerve via nicotinic acetylcholine receptors
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Shirai, Kazuya Takayama, Ikumi Taya, Nobuyoshi Shimoda, and Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Analysis of target genomic regions of DNA methyltransferase3aa (Dnmt3aa) in zebrafish.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunya Hozumi, Hiroya Katayama, Jia Zeyuan, and Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Study on the relationship between neural gene expression and dedifferentiation in early stage of carcinogenesis.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Control of cell proliferation in zebrafish fin regeneration. -Position-dependent cell proliferation-.
3. 学会等名 沖縄科学技術大学院大学 (OIST) セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruko Takahashi and Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 In vitro analysis of tumor microenvironment formation process around cancer cells.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunya Hozumi, Hiroya Katayama, Yukinari Haraoka, Tohru Ishitani, and Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Study on function of neuroendocrine-like cell in cancer progression in a zebrafish melanoma model.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki Shirai, Kazuya Takayama, Ikumi Taya, Nobuyoshi Shimoda, and Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 Identification of target genomic regions of DNA methyltransferase3aa (Dnmt3aa) in zebrafish.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	下田 修義 (Shimoda Nobuyoshi) (90416173)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・再生再生医学研究部・室長 (83903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------