

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05956

研究課題名（和文）セントロメアDNAメチル化が保証する生殖細胞発生システムの検証

研究課題名（英文）Verification of germline development ensured by centromere DNA methylation.

研究代表者

山崎 大賀（Yamazaki, Taiga）

北里大学・北里大学メディカルセンター・上級研究員

研究者番号：90524231

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）：本研究では特定のゲノム配列におけるDNAメチル化状態を改変する事が可能なエピゲノム編集技術を確立し、マウス受精卵に応用することで初期胚発生に重要な役割を果たすDNAメチル化修飾の解析を行った。その結果、生殖細胞内において本来低メチル化状態を示すセントロメアのDNAメチル化を人為的に高メチル化状態に操作したマウス受精卵において著しい発生障害を認めた。以上から、セントロメアのDNA低メチル化はマウス初期胚発生において重要なエピゲノムとして機能している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本解析手法は特定ゲノム配列のエピゲノムと、それに関与する生物学的事象との因果関係を明らかにする事が可能であり、本研究によって実際の実施例が示された事は特筆すべき成果である。また、本手法は学術的な知見を得るための手法のみならず、遺伝子発現制御を介した疾患治療などの応用研究につながる可能性を秘めている事から今後の発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established an epigenome editing technology that can modify DNA methylation of specific genomic sequences and applied it to mouse embryos to analyze DNA methylation that plays an important role in early embryonic development. We found that fertilized embryos which normally show hypomethylated centromeres, exhibited significant developmental defects when hypomethylated centromeres were artificially methylated by epigenome-editing. This result indicates that centromere DNA hypomethylation functions as an important epigenome in early mouse embryogenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DNAメチル化 エピゲノム編集 セントロメア 生殖細胞 初期胚発生

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の形成過程では、DNA メチル化やヒストン H3K9 トリメチル化など抑制状態のエピゲノムや刷り込み遺伝子修飾がゲノムワイドに消去されるエピゲノムの再プログラム化という現象が生じる (Sasaki and Matsui, *Nat. Rev. Genet.*, 2008)。この一方で、遺伝子領域だけでなく遺伝子をコードしないセントロメアやペリセントロメアなどの「非コード DNA」においても再プログラム化に伴った DNA 脱メチル化が生じることが明らかになっている (Yamagata et al., *Dev. Biol.*, 2007)。

マウスの非コード DNA であるセントロメアはマイナーサテライト、ペリセントロメアはメジャーサテライトと呼ばれるタンデムリピートから構成されるが、この配列は通常体細胞においては高度にメチル化されている。分化誘導を受けたばかりの E10.5 の始原生殖細胞においても高いメチル化状態を示すが、E13.5 にかけて再プログラム化が生じ、セントロメアも大規模に脱メチル化を受ける。この脱メチル化状態は精巣内において精原細胞が精子に分化する過程、受精後の初期胚発生に至るまで低メチル化状態を保っており、着床後の細胞分化が生じるタイミングで高メチル化状態に変化する。セントロメア・ペリセントロメアは全ゲノムの 10 数パーセントを占める大規模な染色体領域であり、このような領域の DNA が低メチル化状態であることは何かしらの生殖細胞特有の機能を担っていることが予想される。しかし、解析対象が遺伝子をコードしない領域であることや、DNA メチル化改変の手法が存在しなかったことから、この非コード DNA の脱メチル化が生殖細胞においてどのような機能を有しているかは不明なままであった。

2. 研究の目的

生体内における体細胞のほとんどが高メチル化状態のセントロメア・ペリセントロメアとなっている一方でなぜ生殖系列の細胞のほとんどが低メチル化状態に変化するのかという学術的問いに対し、本研究ではセントロメア・ペリセントロメア DNA のみを人為的に高メチル化状態にしたマウス受精卵を作出し、その表現型を解析することで生殖細胞におけるセントロメア・ペリセントロメアの DNA メチル化機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

セントロメア・ペリセントロメア特異的な DNA メチル化導入手法の確立

ゲノム編集技術で用いられる TALE や Cas9 といった DNA 結合モジュールをエピゲノム修飾酵素と組み合わせる事で、任意の染色体領域におけるエピゲノムを書き換える事が可能なエピゲノム編集技術が開発されている。本研究においてもこの技術を用いることで、セントロメア・ペリセントロメア特異的に DNA メチル化導入可能な技術開発を行う事とした。セントロメアを認識する TALE (TALMin) またはペリセントロメアを認識する TALE (TALMaj) (Miyanari et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2013) と DNA メチル化酵素である SssI との融合タンパク質 TALMin-SssI、TALMaj-SssI をそれぞれ発現可能なプラスミドを構築した。これをゲノム中の DNA メチル化がほぼ全て消失している事が知られている Dnmt Triple knockout (Dnmt TKO) ES 細胞に導入し、セントロメアまたはペリセントロメア特異的な DNA メチル化導入が可能かどうかを DNA メチル化状態のライブセルイメージングおよびバイサルファイトシーケンスにより検証した。

セントロメア・ペリセントロメア特異的 DNA メチル化導入を行ったマウス受精卵の表現型解析

セントロメア特異的 DNA メチル化酵素の TALMin-SssI、ペリセントロメア特異的 DNA メチル化酵素の TALMaj-SssI をマウス受精卵に発現させることで標的配列への DNA メチル化導入がマウス受精卵においても可能かどうかについて、近畿大学の山縣一夫教授との共同研究により検証した。エピゲノム編集酵素の発現量が多すぎる場合や少なすぎる場合においては、非特異的なゲノム領域に対する DNA メチル化導入が生じる事や、DNA メチル化導入が不十分となる事が想定されるため、適正な DNA メチル化導入が可能なエピゲノム編集酵素の発現量の検証を行った。次に設定した発現量を用いた時におけるエピゲノム編集酵素発現 DNA メチル化導入胚の胚発生を検証した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

セントロメア・ペリセントロメア特異的な DNA メチル化導入手法の確立

薬剤(ドキシサイクリン: Dox)添加によってセントロメアまたはペリセントロメア特異的な DNA メチル化酵素を発現可能な安定導入細胞株を Dnmt TKO ES 細胞にてそれぞれ構築した(図 1A)。Dnmt TKO ES 細胞はゲノム中の DNA メチル化のほとんどが消失した状態であることが報告されている (Tsumura et al., *Genes to Cells*, 2006, Li et al., *Genome Biol.*, 2015)。DNA メチル化可視化プローブである mCherry-MBD-NLS によって核内 DNA メチル化状態をイメージしても核内において反応するシグナルは認められない。この状態の細胞内にセントロメア DNA メチル化酵素である TALMin-SssI を発現させた結果、核内に特徴的なドット状のシグナルとしてメチル化 DNA のシグナルが集積する様子が観察された(図 1B)。同様にペリセントロメア DNA メチル化酵素 TALMaj-SssI を発現させた場合においても DNA メチル化の集積が核内で認められ、その集積シグナルはセントロメアよりも大きいサイズとして検出された。ペリセントロメアはセントロメアよりも大きい染色体ドメインであることから、この結果はエピゲノム編集酵素の標的的特異性によるものと考えられた。一方で、酵素活性を欠失したペリセントロメア DNA メチル化酵素を発現させた場合にはメチル化 DNA

の集積は認められなかった事から、このシグナルの集積は DNA メチル化によるものであった。また、導入された DNA メチル化をバイサルファイトシーケンスによって検証した結果、セントロメアの DNA メチル化状態は 0% から 61% へと上昇し、ペリセントロメアについては 0.8% から 45% へと配列特異的に DNA メチル化状態が亢進することを確認した。また、セントロメアへの DNA メチル化導入を行った Dnmt TKO ES 細胞については著しい増殖阻害が生じ、細胞周期が G2 期で停止する事を FACS 解析により見出した。

セントロメア・ペリセントロメア特異的な DNA メチル化導入を行ったマウス受精卵の表現型解析

Dnmt TKO ES 細胞を用いた検証によって標的的特異性を確認した DNA メチル化酵素をマウスの受精卵に発現させ、導入された DNA メチル化の評価を行った(図 2A)。mCherry-MBD-NLS によるイメージングの結果、エピゲノム編集酵素を発現しない(Mock) 2 細胞期胚では核小体周囲にシグナルが弱いながらも DNA メチル化のシグナルが認められた。一方で、セントロメアおよびペリセントロメア DNA メチル化導入胚においては核小体周囲および核内において DNA メチル化シグナ

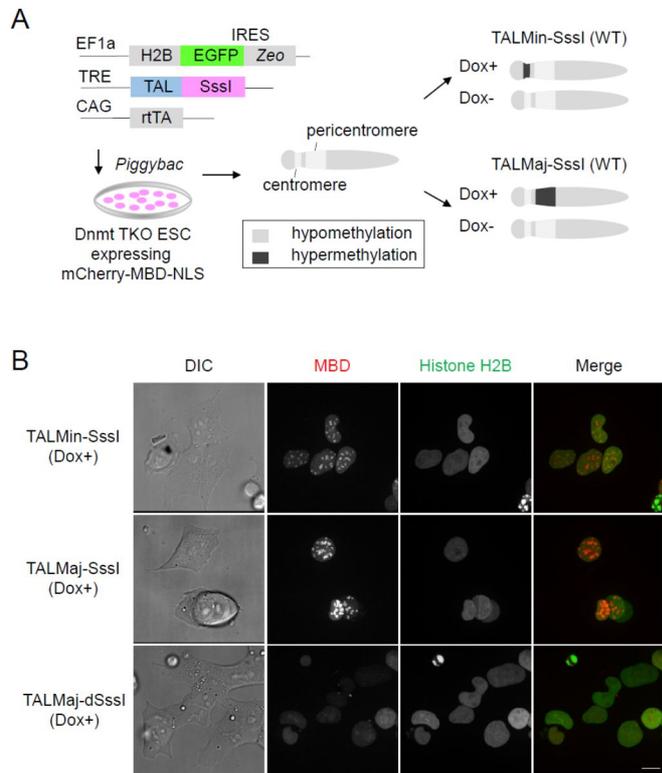


図1 Dnmt TKO ES細胞を用いたセントロメア・ペリセントロメアへのDNAメチル化誘導

A. Dnmt TKO ES細胞に対するセントロメア・ペリセントロメアへのDNAメチル化誘導スキーム。薬剤(ドキシサイクリン: Dox)添加によってエピゲノム編集酵素(TAL-SssI)の発現誘導を行う事で標的配列特異的なDNAメチル化導入を行う。TALMin-SssIはセントロメア特異的なDNAメチル化酵素、TALMaj-SssIはペリセントロメア特異的なDNAメチル化酵素。

B. DNAメチル化導入を行ったDnmt TKO ES細胞における細胞内DNAメチル化領域のイメージング。上段: セントロメア特異的なDNAメチル化酵素発現細胞、中段: ペリセントロメア特異的なDNAメチル化酵素発現細胞、下段: 酵素活性欠失ペリセントロメア特異的なDNAメチル化酵素発現細胞。DIC(明視野)、MBD(メチル化DNA: mCherry-MBD-NLS)、Histone H2B(クロマチン: Histone H2B-EGFP)、Merge(重ね合わせ)。スケールバー10µm

ルが亢進する様子が観察された。また、亢進した核内の DNA メチル化領域はセントロメア DNA メチル化導入胚よりもペリセントロメア DNA メチル化導入胚において大きいサイズとして検出されており、これは Dnmt TKO ES 細胞で得られた結果と一致した。導入された DNA メチル化をバイサルファイトシーケンスで検証した結果、セントロメア DNA メチル化導入胚では約 13%だったセントロメアの DNA メチル化が 50%近くまで亢進することを確認した。ペリセントロメア DNA メチル化導入胚においても 19%だった DNA メチル化が 59%へと更新する事を確認している (Yamazaki et al., *PLoS One*, 2017)。

この DNA メチル化導入を行

った卵子について胚発生を検討した結果、体外受精 96 時間後における桑実胚・胚盤胞への発生率は Mock において 75%、ペリセントロメア DNA メチル化導入胚で 65%である一方で、セントロメア DNA メチル化導入胚では 23%であり、セントロメア DNA メチル化導入胚において著しい発生障害を認めた。発生停止が細胞周期のどのタイミングで生じているかについて、染色体を mCherry-MBD-NLS、DNA 複製フォークを PCNA-EGFP によって可視化し、M 期から PCNA が核内で集積した局在を示すまでの時間を G1 期、PCNA の集積シグナルが確認される時間を S 期、PCNA が消失して染色体構造が形成されるまでの時間を G2 期、染色体構造を示す時間を M 期として、2 細胞期から 4 細胞期までの期間における各細胞周期の所要時間を算出した。その結果、セントロメア DNA メチル化導入胚では G2 期の伸長が認められた。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

エピゲノム編集の方法論については既に様々な論文で報告されている (Nakamura et al., *Nat. Cell Biol.*, 2021)。ゲノムの部位特異的なクロマチンの化学修飾と細胞生物学的なイベントとの因果関係を調べる事が可能となった事から、遺伝子の発現制御領域におけるクロマチン化学修飾と遺伝子発現との因果関係や、ゲノムインプリンティングにおける DNA メチル化制御の役割を解明するのに効果的なツールとしてエピゲノム編集は多く使用されている。一方で、本研究ではセントロメアやペリセントロメアなど巨大な染色体ドメインを対象に、それ自身の DNA メチル化機能を調べるために本ツールを使用した。これら染色体ドメイン自身は遺伝子をコードしていない事から、クロマチンの化学修飾それ自体が細胞機能の発現に重要な役割を有している可能性が考えられる。実際に本研究によって特殊な幹細胞や、初期胚発生において DNA の低メチル化状態が細胞増殖に重要な役割を果たしている可能性が示唆された事は特筆すべき成果であると考えられる。

(3) 今後の展望

どのような分子メカニズムでセントロメアの DNA メチル化修飾と細胞増殖機能が連動しているかについては解明する余地が残っており、今後の研究課題である。現在、DNA メチル化修飾の改変によって影響を受けるヒストン修飾や、セントロメア局在タンパク質について検証を行っている。また、細胞増殖抑制が生じるタイミングにおけるトランスクリプトーム解析を実施することで、どのような分子メカニズムによってこの現象が起こっているのかを明らかにする予定である。本研究において得られた成果の一部については現在論文投稿準備中である。

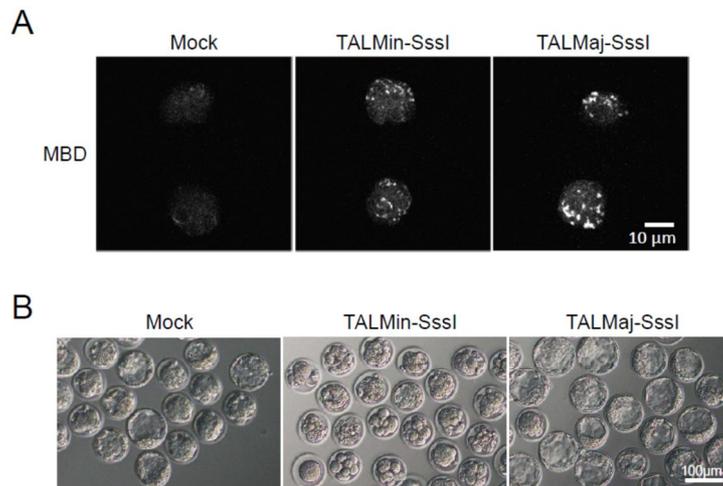


図2 マウス受精卵におけるセントロメア・ペリセントロメアへのDNAメチル化導入

A. エピゲノム編集を行った2細胞期胚におけるDNAメチル化状態。Mock (エピゲノム編集酵素発現無し)、TALMin-Sssl (セントロメアDNAメチル化酵素)、TALMaj-Sssl (ペリセントロメアDNAメチル化酵素)、MBD (mCherry-MBD-NLS:メチル化DNA)、スケールバー10μm。

B. エピゲノム編集を行ったマウス受精卵の体外受精96時間後における胚発生の様子。スケールバー100μm。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Jun Ueda, Taiga Yamazaki, Hiroshi Funakoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Toward the Development of Epigenome Editing-Based Therapeutics: Potentials and Challenges	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E4778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24054778.	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 Taiga Yamazaki, Yu Hatano, Noritada Kobayashi, Kazuo Yamagata	4. 巻 2577
2. 論文標題 Targeted DNA Methylation in Mouse Early Embryos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 243-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2724-2_17	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 Yasuoka Yukiko, Izumi Yuichiro, Fukuyama Takashi, Omiya Haruki, Pham Truyen D., Inoue Hideki, Oshima Tomomi, Yamazaki Taiga, Uematsu Takayuki, Kobayashi Noritada, Shimada Yoshitaka, Nagaba Yasushi, Yamashita Tetsuro, Mukoyama Masashi, Sato Yuichi, Wall Susan M., Sands Jeff M., Takahashi Noriko, Kawahara Katsumasa, Nonoguchi Hiroshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Effects of Roxadustat on Erythropoietin Production in the Rat Body	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1119 ~ 1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27031119	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 Yasuoka Yukiko, Izumi Yuichiro, Fukuyama Takashi, Inoue Hideki, Oshima Tomomi, Yamazaki Taiga, Uematsu Takayuki, Kobayashi Noritada, Shimada Yoshitaka, Nagaba Yasushi, Mukoyama Masashi, Sato Yuichi, Sands Jeff M, Kawahara Katsumasa, Nonoguchi Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Effects of Angiotensin II on Erythropoietin Production in the Kidney and Liver	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5399 ~ 5399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26175399	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 Yukiko Yasuoka, Takashi Fukuyama, Yuichiro Izumi, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Kengo Yanagita, Tomomi Oshima, Taiga Yamazaki, Takayuki Uematsu 2, Noritada Kobayashi 2, Yoshitaka Shimada 5, Yasushi Nagaba, Masashi Mukoyama, Tetsuro Yamashita, Yuichi Sato, Jeff M Sands, Katsumasa Kawahara, Hiroshi Nonoguchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Erythropoietin production by the kidney and the liver in response to severe hypoxia evaluated by Western blotting with deglycosylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiol Rep.	6. 最初と最後の頁 e14485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14485	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 Yamazaki T, Hatano Y, Taniguchi R, Kobayashi N, Yamagata K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Editing DNA Methylation in Mammalian Embryos.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020637	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山崎大賀, 谷口稜弥, 波多野裕, 小林憲忠, 山縣一夫
2. 発表標題 マウスES細胞増殖におけるセントロメアDNAメチル化機能
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 谷口稜弥, 波多野裕, 山崎大賀, 舛本寛, 小布施力史, 山縣一夫
2. 発表標題 マウス初期胚特異的なセントロメア構造および機能の分子機序の解明
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 植松崇之, 山崎大賀, 小林憲忠, 井上純一郎, 清木元治, 坂本毅治
2. 発表標題 Listeria monocytogenes感染におけるHIF-1活性化因子Mint3を介した自然免疫応答機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヘリコバクター・ピロリ除菌後の患者が胃癌を発症するリスクを評価する方法及びそのためのキット	発明者 福山 隆, 小林 憲忠, 山崎 大賀他	権利者 学校法人北里研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-140097	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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