

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06502

研究課題名（和文）ニューロンにおける維持型DNAメチル化酵素DNMT1の機能解明

研究課題名（英文）Functional elucidation of maintenance DNA methyltransferase DNMT1 in neurons

研究代表者

波平 昌一（Namihiro, Masakazu）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：60379534

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）：本研究は、非分裂性のニューロンにおけるDNAメチル化酵素DNMT1の役割と、その機能異常と精神疾患の関連を明らかにすることを目的とした。本研究の遂行の結果、DNMT1が神経機能の正常な発現に必須な遺伝子群のエンハンサー領域のDNAメチル化の維持に関わることが明らかとなった。更に、特定のゲノム領域においては、DNMT1がDNA脱メチル化にも寄与することも見出した。また、ヒトニューロンにおいてもマウスニューロンと同様の役割を担っていることも示唆した。これらの結果は、DNMT1の機能に関する新規の知見を提示すると共に、DNMT1の機能異常が神経疾患の発症に関わることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の遂行から、ニューロンにおけるDNMT1が担うゲノム領域特異的なDNAメチル化制御機構について新たな知見を提示することができた。加えて、DNMT1が脳神経の発達と機能発現に重要な役割を担うとともに、その機能異常が精神疾患の発症に関わることを示唆することができている。このことは、DNMT1やDNAメチル化が、精神疾患のみならず発達障害や幼児期の環境ストレスによるPTSDなどの治療の標的なる得る可能性を示唆している。従って、本研究の結果は、学術的価値が高いだけでなく、臨床的側面からも重要な意義を持つと考えている。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the role of the DNA methyltransferase DNMT1 in postmitotic neurons and the association between its dysfunction and psychiatric disorders. The results revealed that DNMT1 is involved in the maintenance of DNA methylation in enhancer regions of genes that are essential for the neuronal functions. Furthermore, we found that DNMT1 also contributes to DNA demethylation in specific genomic regions. We also suggested that DNMT1 plays a similar role in human neurons as in mouse neurons. These results provide novel insights into the function of DNMT1 and suggest that dysfunction of DNMT1 contributes to the pathogenesis of neurological diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNAメチル化 DNMT1 神経細胞 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスなどの哺乳類において、エピジェネティクス制御の一つである DNA メチル化のニューロンにおける異常が、精神疾患発症や幼児期のストレス暴露による成体の行動異常などに関与することが指摘されている (Bayraktar et al., *Front Mol Neurosci.* 2018)。ところが、分裂を終えたニューロンで起こる特定のゲノム領域の DNA メチル化・脱メチル化の分子メカニズムについては、未だ不明な点が多い。

分裂性の細胞において、ゲノム上の DNA メチル化パターンを娘細胞に引き継ぐために必要な維持型メチル化酵素 DNMT1 は、ニューロンにおいても豊富に発現している。さらに、ヒトの死後脳の解析から、統合失調症や双極性障害の患者脳においては、健常者と比較してメチル化 DNA がゲノム中に豊富に存在することと共に、DNMT1 の発現量が高いことが報告されている (Veldic et al, *PNAS.*, 2005)。しかし、維持型メチル化酵素である DNMT1 の非分裂性ニューロンでの役割や機能については、ほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまで、ニューロン発達における DNA メチル化制御についての研究を実施してきた。その過程で最近、ニューロン特異的に DNMT1 を欠損する遺伝子改変マウスを用いた研究により、ニューロンにおいて、組織特異的な遺伝子発現を調節するゲノム上のエンハンサー領域のメチル化に DNMT1 が関与するという知見を得た。これは、ゲノム領域全体のメチル化維持のみに機能するとされてきた維持型メチル化酵素 DNMT1 が、特定のゲノム領域のメチル化にも関与するという、全く新しい知見である。本研究はこの新規知見に基づき、ニューロン特異的に DNMT1 を欠損または過剰発現するマウスと、ヒトの脳組織を模倣したヒト大脳オルガノイドを利用し、マウスとヒトのニューロンにおける DNMT1 の機能と役割を明らかにし、精神疾患との関連を明示することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、神経系細胞特異的に DNA 化学修飾酵素を欠損 (CKO マウス)、又は過剰発現させたマウス (TG マウス) や培養神経系細胞を用いて、以下の研究を行った。

- 1) ニューロンにおいて DNMT1 が制御する領域特異的なメチル化制御機構の解明  
タンパク質相互作用解析やクロマチン免疫沈降法 (ChIP-seq) を基盤として、DNMT1 をエンハンサー領域ヘリクルートする分子を同定し、マウスニューロンにおける DNMT1 によるエンハンサー領域のメチル化制御機構のメカニズムの解明を目指した。
- 2) ニューロン特異的な DNMT1 の発現変動と精神疾患との関連解析  
遺伝子改変マウスに対して全ゲノムレベルのメチル化解析を行うとともに、マウスニューロンにおいて DNMT1 の欠損に伴って変動する遺伝子群を網羅的に解析した。ここで得られた結果と、疾患患者で認められた発現変動遺伝子のデータと照らし合わせ、DNMT1 による DNA メチル化制御と精神疾患との関連について解析した。
- 3) ヒトニューロンにおける DNMT1 の機能解析  
ヒト大脳オルガノイド、及び、ヒト胎児由来神経幹細胞を利用し、ヒトニューロンにおける DNMT1 の機能解析を実施した。

## 4. 研究成果

- 1) ニューロンにおいて DNMT1 が制御する領域特異的なメチル化制御機構の解明  
まず、ニューロンの DNMT1 のゲノム DNA メチル化に対する役割を更に詳細に検討するために、発達初期のニューロンの全ゲノムレベルで DNA メチル化状態を明らかにし、これまでに実施した野生型及び DNMT1 欠損ニューロンの DNA メチル化のデータと比較した。その結果、DNMT1 の制御が認められるエンハンサー領域は、神経機能の発現に重要な遺伝子群であり、発達過程で顕著に DNA 脱メチル化される領域であることが明らかになった。更に興味深いことに、特定のレトロトランスポゾン領域においては、DNMT1 の欠損によりメチル化レベルの上昇が観察された。これらの結果は、DNMT1 はエンハンサー領域においては発達依存的な DNA 脱メチル化を防ぐ役割があるが、レトロトランスポゾン領域においては DNA 脱メチル化の促進に寄与することを示唆していた。

次に、ゲノム全体での DNMT1 の結合領域を同定するために、培養したマウスニューロンに対して DNMT1 抗体を用いた ChIP-seq を実施した。その結果、DNMT1 は発達依存的に脱メチル化される活性化型エンハンサー領域に結合すること、及び、神経特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域にも結合していることが明らかとなった (図 1)

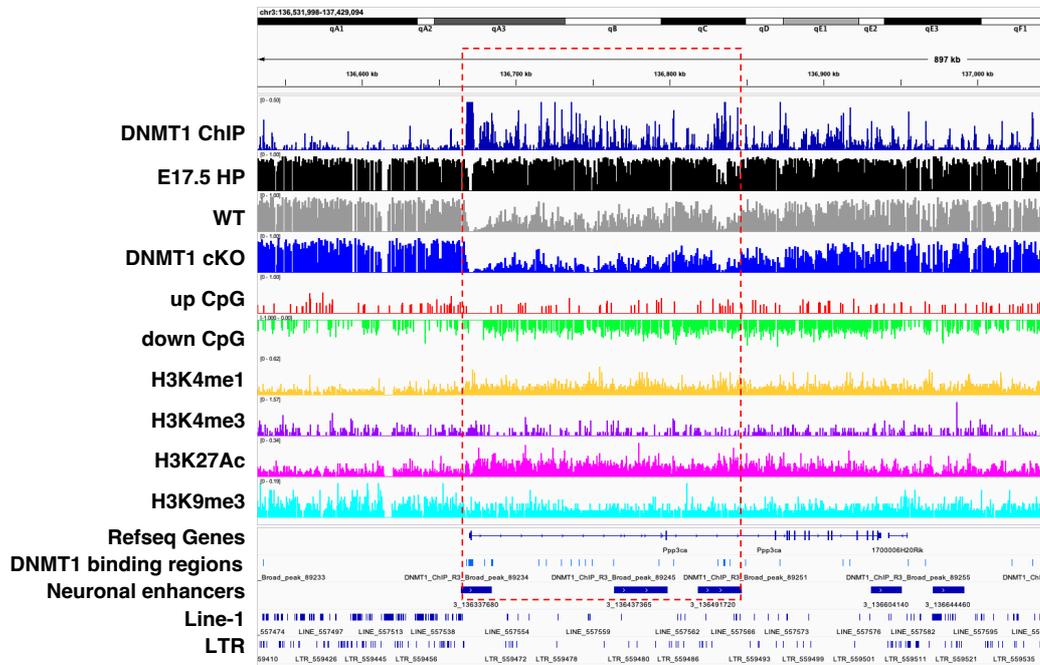


図1 マウスニューロンにおける *Ppp3ca* 遺伝子近傍における DNMT1 結合領域、及び、DNA メチル化レベル

更に、DNMT1 のニューロンの核内での局在を詳細に明らかにするために、超解像顕微鏡を用いた修飾ヒストンの蛍光観察技術を確立した (Hagihara, 2021)。この技術を用いてニューロンにおける DNMT1 の核内局在を直接的に観察したところ、エンハンサー領域に集積することが知られている 27 番目のリジンがアセチル化されたヒストン H3 タンパク質と DNMT1 が共局在することが認められた。これは、上記 ChIP-seq の結果である DNMT1 のエンハンサー領域への集積を支持する結果となっている。

ニューロンにおいて DNMT1 が相互作用するタンパク質群を網羅的に明らかにするために、培養したニューロンに対して FLAG で標識された DNMT1 を過剰発現し、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を実施した後、質量分析装置により沈降されたタンパク質群を解析した。その結果、神経細胞以外の細胞でプロモーターやエンハンサーの活性に関わるクロマチンリモデリング因子の CHD2 タンパク質が同定された。更に、DNMT1 と相互作用するタンパク質として、メチル化された DNA をヒドロキシメチル化することで DNA 脱メチル化に寄与するヒドロキシメチル化酵素 TET2 及び TET3 が同定された。DNMT1 の CHD2 や TET3 との相互作用については、マウス培養細胞を用いた免疫沈降法によっても確認された。また、同じくマウス培養細胞を用いた ChIP 解析により、DNMT1 の過剰発現が TET3 のプロモーター領域への結合を防いでいることが明らかとなった。

上記のそれぞれの実験の結果を合わせると、DNMT1 は CHD2 によってエンハンサー領域にリクルートされ、その領域においては TET3 の DNA への結合を防ぎ DNA 脱メチル化を阻害することで DNA メチル化の維持を行っているが、レトロトランスポゾン領域においては、TET3 と協調して DNA 脱メチル化に寄与しているということが示唆された。

## 2) ニューロン特異的な DNMT1 の発現変動と精神疾患との関連解析

DNMT1 を欠損したニューロンの網羅的遺伝子発現解析の結果から、*Ppp3ca* や *Srgap3* などの遺伝子の発現上昇が認められた。更に、ニューロンにおける全ゲノムレベルの DNA メチル化解析から、DNMT1 の欠損が *Ppp3ca* 遺伝子のエンハンサー領域の脱メチル化を誘導していることが明らかとなった (図 1)。*Ppp3ca* 遺伝子は、カルシニューリンのサブユニットタンパク質をコードしており、最近では海馬におけるカルシニューリンの機能異常が統合失調症の発症原因となることが示唆されている。また、統合失調症患者において *Srgap3* 遺伝子の発現異常が認められている。これらのことから、DNMT1 の発現異常が、*Ppp3ca* や *Srgap3* など遺伝子のエンハンサー領域の DNA メチル化状態を変化させ、統合失調症の発症を誘導している可能性が考えられた。

### 3) ヒトニューロンにおける DNMT1 の機能解析

ヒト大脳オルガノイドの培養には長期間を要するため、それに先立ってヒト胎児由来神経幹細胞を用いてヒトニューロンにおける DNMT1 の役割解明を目指した。ヒト胎児由来神経幹細胞の培養に関してはその大量培養法を確立するとともに、ヒトニューロンやその他の神経系細胞のエピジェネティクス機構に対する各種の機能性物質の影響を詳細に解析する技術も確立した (Murotomi, 2022)。ヒト胎児由来神経幹細胞においてヒト DNMT1 の発現減弱 (次ページ図 2 下段、shRNA-DNMT1) を行い、ニューロン分化の誘導を行ったところ、コントロール群の神経幹細胞 (図 2 上段、CTRL) と比較して、DCX タンパク質を発現するニューロンへの分化の促進が認められた (図 2 右、グラフ)。また、マウスニューロンで観察された場合と同様に、DNMT1 の発現減弱したニューロンにおいては、神経突起がコントロール群と比較してより伸長している傾向が認められた。これらのことからヒトのニューロンにおいても DNMT1 はマウスと同様の役割を担っていることが示唆された。

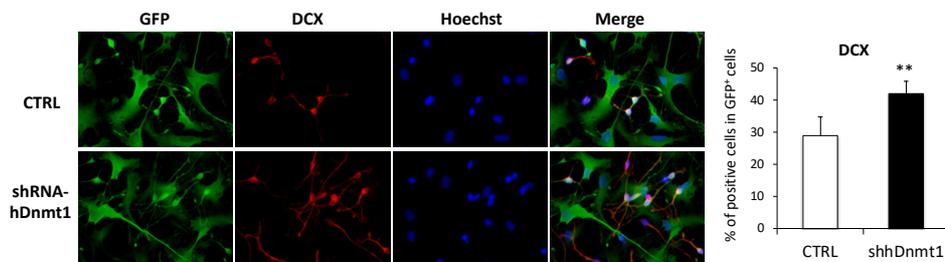


図 2 ヒト胎児由来神経幹細胞における DNMT1 の発現減弱によるニューロン分化の促進

上記の通り、本研究の遂行により、ニューロンにおいて DNMT1 は DNA メチル化の維持だけでなく、DNA 脱メチル化にも寄与するという新たな知見を示すことができた。更に、上記の結果は DNMT1 の機能異常が統合失調症の発症に関わることを示唆している。加えて、上記研究を進める上で確立した技術を用いて、DNMT1 による DNA メチル化修飾に必須な S-アデノシルメチオニンが組織老化の制御に関わることも見出した (Hayashi, 2022)。今後は、本研究の遂行過程で確立した技術と、ヒト大脳オルガノイド培養技術を用いて更に本研究を進め、ヒトニューロンにおける DNMT1 の詳細な機能と、神経疾患や老化との関連をより詳細に解明していくことを目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hayashi Yoshiki, Kashio Soshiro, Murotomi Kazutoshi, Hino Shinjiro, Kang Woojin, Miyado Kenji, Nakao Mitsuyoshi, Miura Masayuki, Kobayashi Satoru, Namihira Masakazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Biosynthesis of S-adenosyl-methionine enhances aging-related defects in Drosophila oogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-09424-1	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 Hagihara Hideo, Shoji Hirotaka, Otabi Hikari, Toyoda Atsushi, Katoh Kaoru, Namihira Masakazu, Miyakawa Tsuyoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Protein lactylation induced by neural excitation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109820~109820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109820	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 Suzuki Godai, Saito Yutaka, Seki Motoaki, Evans-Yamamoto Daniel, Negishi Mikiko, Kakoi Kentaro, Kawai Hiroki, Landry Christian R., Yachie Nozomu, Mitsuyama Toutai	4. 巻 7
2. 論文標題 Machine learning approach for discrimination of genotypes based on bright-field cellular images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Systems Biology and Applications	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41540-021-00190-w	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 Hagihara Hideo, Shoji Hirotaka, Otabi Hikari, Toyoda Atsushi, Katoh Kaoru, Namihira Masakazu, Miyakawa Tsuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Protein lactylation induced by neural excitation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 428362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.02.02.428370	査読の有無 無
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 Lee Jong-Hun, Saito Yutaka, Park Sung-Joon, Nakai Kenta	4. 巻 27
2. 論文標題 Existence and possible roles of independent non-CpG methylation in the mammalian brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsaa020	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 Kurumida Yoichi, Saito Yutaka, Kameda Tomoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Predicting antibody affinity changes upon mutations by combining multiple predictors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76369-8	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 Yamaguchi Hideki, Saito Yutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Evotuning protocols for Transformer-based variant effect prediction on multi-domain proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 434175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.03.05.434175	査読の有無 無
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 Murotomi Kazutoshi, Kagiwada Harumi, Hirano Kazumi, Yamamoto Shoko, Numata Noriaki, Matsumoto Yo, Kaneko Hidekazu, Namihira Masakazu	4. 巻 238
2. 論文標題 Cyclo glycyproline attenuates hydrogen peroxide induced cellular damage mediated by the MDM2 p53 pathway in human neural stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 434 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30940	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 波平昌一、木村文香、齋藤裕、松田泰斗、今村拓也、大塚まき、五十嵐勝秀、三浦史仁、伊藤隆司、堅田明子、中島欽一
2. 発表標題 神経細胞におけるDNMT1によるエンハンサー領域のメチル化制御
3. 学会等名 第13回エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masakazu Namihira, Ayaka Kimura, Yutaka Saito, Taito Matsuda, Takuya Imamura, Hirofumi Noguchi, Maky Otsuka I., Katsuhide Igarashi, Kinichi Nakashima
2. 発表標題 DNA-methyltransferase 1 participates in methylation of neuronal enhancer in post-mitotic neuron of mammalian brain.
3. 学会等名 Neuroscience 2019, Society for Neuroscience, Chicag, IL (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	新木 和孝  (Araki Kazutaka)  (60514255)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員   (82626)	
研究分担者	齋藤 裕  (Saito Yutaka)  (60721496)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領 域・主任研究員   (82626)	

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
---------	---------