

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06449

研究課題名（和文）In situエピジェネティクス：分化・発生のH3K27me3機能解析の新戦略

研究課題名（英文）In situ epigenetics: a new strategy for studying H3K27me3 in cellular differentiation and development

研究代表者

新井 大祐（Arai, Daisuke）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20624951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：分化や発生におけるH3K27me3などのヒストン修飾の重要性は明らかだが、ゲノム上に散在する個々の修飾の本当の機能の検証はほとんどなされていない。この問題を解決するために、本研究ではゲノム上の特定の場所に存在するH3K27me3（in situ H3K27me3）を研究するためのエピゲノム編集ツールならびに改変ES細胞（PRC2スイッチES細胞）を開発した。またES細胞に対する特異的かつ高効率な両アリルノックイン手法（BiPoD）を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はエピジェネティクスの重要な未解明問題に対する解決の手がかりを与えるものである。開発したエピゲノム編集ベクターやPRC2スイッチES細胞は分化や発生におけるH3K27me3の意義の解明に貢献することが期待される。また本研究で開発したBiPoDはES細胞のノックイン効率と特異性を劇的に改良する手法で、エピジェネティクスのみならず多様な研究を加速させるポテンシャルを持つ。

研究成果の概要（英文）：In spite of the importance of histone modifications such as H3K27me3 in cellular differentiation and development, the true function of individual modifications scattered throughout the genome has rarely been examined. To address this issue, we developed epigenome editing tools and modified ES cells (PRC2-switch ES cells) to study in situ H3K27me3. In addition, a novel knock-in method, termed BiPoD, was developed. BiPoD allows us to efficient biallelic knock-in in mouse ES cells.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス エピゲノム編集 ヒストン修飾 細胞分化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が分化を繰り返して様々に姿を変えていく発生の過程では、必要な遺伝子だけを発現し不必要な遺伝子は抑制する『使い分け』の機構が不可欠である。その基盤として機能しているのが、DNA がヒストンタンパク質の化学修飾によるエピジェネティックな制御機構である。中でも PRC2 という複合体酵素が付加するヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) によるエピジェネティック制御は、分化・発生に伴う遺伝子の使い分けの基盤として重要視されている。H3K27me3 は長大なゲノムの中の特定の領域にポストイットのように可逆性と安定性をもって付加されるため、分化段階ごとの標的特異的な制御が可能である。

エピゲノム解析により PRC2 / H3K27me3 の多数の標的遺伝子が同定されており、分化・発生における様々な機能が報告されてきた。しかし従来の研究では機能解析のために H3K27me3 修飾酵素である PRC2 そのものを欠失させ、ゲノム全域の H3K27me3 を消去しているため、ゲノム上の特定の領域の H3K27me3 が対応する遺伝子の制御に本当に関与しているのか、重要なのは H3K27me3 ではなく PRC2 の非触媒性機能ではないか、という根本的な問題が放置されていた。我々は以前に細胞分化および胚発生において H3K27me3 が *Nodal* 遺伝子の上流に存在し、転写抑制に関わることを発見、報告した (Arai, *Dev Biol*, 2010; Arai, *Mech Dev*, 2015)。しかしこの研究でもアンチセンスオリゴや薬剤により PRC2 の機能を細胞全体で阻害しており、*Nodal* 遺伝子の上流の H3K27me3 が本当に転写制御に関わっているのかは不明のままだった。このような背景から、ヒストン修飾の機能を本当の意味で理解するには、PRC2 ではなくゲノム上の個々の H3K27me3 自体の機能解析が必要だという考えに至った。

2. 研究の目的

本研究ではゲノム上の特定の場所に存在する H3K27me3 のことを「*in situ* H3K27me3」と呼称し、分化・発生において *in situ* H3K27me3 が特定の遺伝子発現を制御していることを証明するため、ゲノム全域ではなく、個々の *in situ* H3K27me3 を特異的に調節する手法を確立する。また H3K27me3 の働きと PRC2 の非触媒性の機能を区別して解析可能なツール (PRC2 スイッチ ES 細胞) を開発する。これらを用い、分化・発生における H3K27me3 の役割を本当の意味で解き明かすための新戦略「*in situ* エピジェネティクス」を立ち上げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in situ* H3K27me3 調節ツールの作製および検証

H3K27me3 メチル化酵素 PRC2 の構成因子や H3K27 関連酵素、その補因子を dCas9 と融合し、*Nodal* 遺伝子の上流領域を標的としたガイド RNA の発現カセットと合わせた CRISPR/dCas9 発現ベクターを作製した。これをマウス ES 細胞にトランスフェクションして一過的に発現させ、*Nodal* 遺伝子の発現に対する影響を qPCR により確認した。

(2) ES 細胞への相同組み換えノックイン

マウス ES 細胞への相同組み換えノックイン手法を以下のように改良した。*Polq* 遺伝子に対する shRNA を一過的に発現させ、その翌日に環状ドナーベクターと標的領域への CRISPR/Cas9 ベクターを導入し、4 時間後に DNA-PK 阻害剤 M3814 を添加した。また shRNA 発現細胞をセレクトするためにピューロマイシンで 24 時間処理した。ノックイン効率はフローサイトメトリックとゲノム PCR により確認した。

(3) PRC2 スイッチ ES 細胞の作出

マウス ES 細胞に 3 段階の改変を施した。*Ezh1* 遺伝子を CRISPR/Cas9 で欠失させた。*Ezh2* 遺伝子の C 末端側に AID (Auxin inducible degron) タグ配列をノックインした。酵素活性を持たない変異 *Ezh2* 遺伝子の Tet-ON 発現カセットを *Rosa26* 領域に導入した。

4. 研究成果

(1) *in situ* H3K27me3 調節ツールとして PRC2 の構成因子である EZH2、EED、JARID2 などを dCas9 に融合したエピゲノム編集ベクターを作製した。これをマウス ES 細胞に一過的に導入し、*Nodal* 遺伝子の上流領域に対する sgRNA とともに発現させ *Nodal* 遺伝子の mRNA 発現への影響を調べたが、転写抑制効果は認められず、PRC2 単独では転写活性状態にある遺伝子を十分に抑制することはできないと考えられた。そこで 2 種類の sgRNA を使い 2 種類の因子を同時に送り込んだところ、dCas9-EZH2 と dCas9-KRAB の共発現により抑制効果が 5 日間持続した。これは dCas9-KRAB 単独よりも強い効果であり、PRC2・H3K27me3 による抑制状態の維持と考えられた (図 1)。また H3K27 脱メチル化酵素 JMJD3、アセチル化酵素 P300、DNA メチル化酵素補因子 DNMT3L のエピゲノム編集ベクターも作製した。

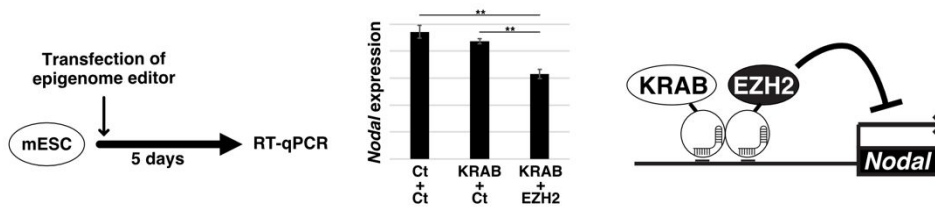


図1 dCas9-EZH2・dCas9-KRABによる転写抑制効果

(2) PRC2 スイッチ ES 細胞の作出にあたり、相同組み換えの効率および特異性が問題となった。両アリルにロックアウト・ロックインを起こす効率は低く、今回のように複数回のロックアウト・ロックインを施す場合には一回ごとに成功のクローンを単離する必要があるが、培養日数の延長による細胞の多分化能の低下は避けられない。また CRISPR/Cas9 によるゲノムへの予期せぬダメージや、ドナーの全長または一部分の非特異的な挿入の可能性も増していく。そこで相同組み換えロックイン手法の改良に取り組んだ。環状ドナーベクターの細胞内線状化、*Polq* 遺伝子のノックダウンによる MMEJ 阻害、DNA-PK 阻害剤 M3814 による NHEJ 阻害を組み合わせ、ドナーの非特異的な挿入を劇的に減少させることに成功した。さらにこの時、片アリルのロックインはほぼ起こらず、100%近い確率で両アリルのロックインとなった。この方法は通常法では不可能だった2箇所標的への両アリル同時(計4箇所)ノックインも達成した。この手法を BiPoD (Biallelic knock-in assisted by *Pol* θ and DNA-PK inhibition) と名付け論文発表した (Arai, *Sci Rep*, 2021)。

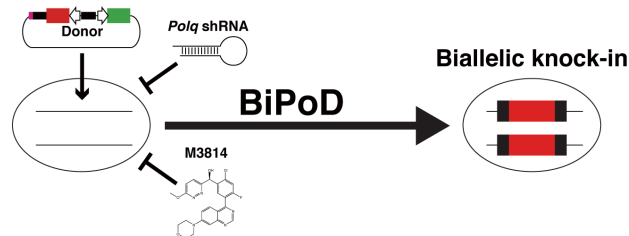


図2 BiPoDの概略図

(3) BiPoD 法を活用し、PRC2 スイッチ ES 細胞の作出に取り組んだ。PRC2 の触媒サブユニットである EZH2 と EZH1 のうち、発生に不要な EZH1 をロックアウトし、重ねて EZH2 に AID タグを挿入した。この細胞に *O_sTIR* 遺伝子を発現させオーキシン処理した結果、EZH2 を1時間以内に分解可能であることが確認された。さらに *Rosa26* 領域に酵素活性を持たない変異 *Ezh2* 遺伝子の Tet-ON 発現カセットを導入し、PRC2 スイッチ ES 細胞を樹立した。

本研究では H3K27 を *in situ* エピジェネティクスにより解析するためのツールを開発した。複数の因子の同時リクルートにより弱いながらも抑制効果が認められることから、今後は因子の組合せによる相乗効果を探索していく。一方、研究の副産物として新たな相同組み換えノックイン手法が開発された。本手法は遺伝子の多様な改変を可能とし、ES 細胞の *in vitro* 分化と組み合わせることにより、分化・発生のエピジェネティクス研究に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Otsuka Satoshi, Kawamura Midori, Fujino Shutaro, Nakamura Fumiaki, Arai Daisuke, Fusetani Nobuhiro, Nakao Yoichi	4. 巻 70
2. 論文標題 Coronarin D, a Metabolite from the Wild Turmeric, <i>Curcuma aromatica</i> , Promotes the Differentiation of Neural Stem Cells into Astrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 3300 ~ 3309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.2c00020	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 Arai Daisuke, Nakao Yoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficient biallelic knock-in in mouse embryonic stem cells by in vivo-linearization of donor and transient inhibition of DNA polymerase γ /DNA-PK	5. 発行年 2021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/s41598-021-97579-8	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 -

〔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 新井大祐, 中尾洋一
2. 発表標題 Improvement of homology-directed repair-mediated knock-in efficiency in mouse embryonic stem cells by using small compounds
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井大祐, 中尾洋一
2. 発表標題 マウスES細胞に対する高効率な両アリルノックイン手法の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 新井大祐	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学2022年2月号『BiPoD：正確かつ高効率な両アレルノックイン新手法』	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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