

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23658091

研究課題名(和文) 遺伝子の細胞核内配置制御機構とその組換えタンパク質高効率産生細胞構築への応用

研究課題名(英文) Regulation of intranuclear arrangement of genes and construction of cells which highly express recombinant proteins

研究代表者

奥村 克純 (OKUMURA, Katsuzumi)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：30177183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換えタンパク質を高効率に生産する動物細胞の構築を目指し、核内のゲノム動態やゲノム編集技術について検討した。結果として、脂肪細胞への分化誘導に伴い発現する遺伝子の核内配置は大きく変化しないこと、ヘミメチル化DNA結合タンパク質UHRF1の過剰発現は核の形態異常を導くこと、葉酸欠乏はDNA低メチル化を介してDNA損傷を導くこと、CRISPR/Cas9システムにより、特定の巨大ゲノム領域を欠失できること、ゼブラフィッシュ細胞の核内複製動態の基本データなどを示した。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of establishment of cells with efficient expression of recombinant proteins, intranuclear genome dynamics and the genome editing method were investigated. The following results were obtained: The intranuclear arrangement of genes during adipocyte differentiation was not changed even if they expressed. Overexpression of hemimethylated DNA binding protein UHRF1 induced the abnormal shape of the nucleus. Folate deficiency causes the DNA hypomethylation and induces the DNA damage. The specific large genomic region can be deleted by a CRISPR/Cas9 system. Various basic data on intranuclear DNA replication dynamics of Zebrafish cultured cells have been collected.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：動物細胞 遺伝子発現 DNAメチル化 ヘテロクロマチン DNA複製 ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の転写に適切な場所が存在するという考えは 10 年以上前からあり、最近になって論文が散見されるようになった (PNAS, 105, 19199, 2008; Nat. Biotechnol., 28, 1089, 2010)。しかしながら核内の配置と遺伝子発現との間には、未だ不明な点が多い。国内外の動向は、本研究代表者を含め、もっぱら核内の空間配置や核の内部構造と関連する転写制御メカニズムの解明を目指す研究に傾注されてきた。したがって、本研究が目指す核内の配置等の制御を物質生産につなげようという視点の研究は皆無である。

研究代表者は、これまでに DNA/RNA FISH の技術を用いて DNA 複製や mRNA 転写開始のタイミングにおいて優れた成果を挙げた (Exp. Cell Res., 274, 189-196, 2002)。最近ではその技術をさらに進展させて DNA 修復の様子を観察できるまでになっている (J. Cell Biol., 183, 1203-1212, 2008)。さらに核マトリクスと転写の関係を明らかにすることで、転写の場やクロマチン構造 (エピジェネティック修飾) が転写活性に重要な働きをしていることを見いだしてきた (Exp. Cell Res., 316, 2731-2746, 2010)。このように研究代表者は、転写の場の研究を長年展開し、核内転写制御に関する情報を熟知しており、核内配置と遺伝子発現、さらにエピジェネティック制御の関係を精査することにより、それらの情報を物質生産に応用することが可能と考えている。

## 2. 研究の目的

遺伝子の発現過程は、mRNA の転写、プロセッシング、翻訳段階からなると考えられてきた。しかし最近、核内における遺伝子の空間配置や mRNA の輸送が、最適な遺伝子発現の誘導に大きく関わることを示された。すなわち、真核細胞で遺伝子を発現させる過程には、(1)核内の配置、(2)mRNA の転写、(3)mRNA の細胞質への輸送、(4)翻訳段階の 4 工程からなり、プロモーターの強化やコドンの最適化などの従来の工夫は、遺伝子発現に関わる過程の一部を強化していたに過ぎない。本研究では、まだ研究の進んでいない(1)と(3)のうち、特に(1)の核内配置の制御に関する研究を行い、エピジェネティック制御との関係を研究することで、タンパク質生産性の向上への情報を提供することを目的とした。一方、ゲノム領域のヘテロクロマチン化には DNA の高メチル化が鍵であり、逆にエピジェネティック制御で低メチル化状態にできれば通常の遺伝子導入法でも遺伝子発現効率の高い細胞の効率的取得が期待できる。研究代表者が見出した DNA 低メチル化が DNA 損傷の原因であるという重要な知見を確認し、遺伝子発現の配置制御による転写効率の高揚という本研究の主課題に加えてエピジェネティック制御異常による DNA 損傷の誘導についても

検討すること、また、新たにゼブラフィッシュの系の導入を考え、細胞レベルの情報など、基本データを集めることも目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究に用いた方法を以下に列挙する。

- (1) 前駆脂肪細胞マウス 3T3-L1 細胞の分化誘導
- (2) RNA/DNA-FISH 法による遺伝子発現の蛍光顕微鏡イメージング可視化解析
- (3) ヘミメチル化 DNA 結合タンパク質 UHRF1 について、野生型の mouse UHRF1 (mUhrf1) と human UHRF1 (hUHRF1) に加え、アミノ酸置換体のそれぞれの cDNA を HaloTag コード配列の 3' 側に挿入した発現ベクターをそれぞれ構築・発現解析
- (4) DNA 損傷マーカーである  $\gamma$ -H2AX の免疫蛍光染色と蛍光顕微鏡イメージング可視化解析
- (5) bisulfite sequencing による特定ゲノム配列のメチル化状態の解析
- (6) ゼブラフィッシュの培養細胞 AB9 株の培養と分子コーミングを用いた複製フォーク進行速度の蛍光顕微鏡イメージング可視化解析

## 4. 研究成果

(1) 遺伝子が発現することで核内配置を変えるかどうかを脂肪細胞の分化に伴って発現が誘導される遺伝子について解析した。すなわち、脂肪前駆細胞マウス 3T3-L1 細胞が脂肪細胞に分化する過程で発現が上昇する遺伝子をモデルとした。分化誘導過程で経時的に細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により PPAR- $\gamma$ , Adiponectin 遺伝子の発現状態を解析した結果、各遺伝子とも発現が上昇していた。次に、これらの遺伝子の転写活性と核内配置の因果関係を明らかにするために、DNA-FISH を行った結果、Adiponectin, PPAR- $\gamma$  遺伝子領域ともに核内配置に変化は見られなかった。また、ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin は、分化の過程で常に核の内側に局在する傾向にある一方で、Adiponectin, PPAR- $\gamma$  両遺伝子は、決まった局在性を示すことは無く、脂肪細胞の分化誘導に伴って発現する遺伝子については、核内配置とは関係しないことが明らかになった。(2) UHRF1 について、野生型の mouse UHRF1 (mUhrf1) と human UHRF1 (hUHRF1) に加え、アミノ酸置換体のそれぞれの cDNA を、HaloTag コード配列の 3' 側に挿入した発現ベクターをそれぞれ構築した。それぞれの発現ベクターを m5S 細胞に導入後 UHRF1 を発現させ、核内局在を確認した結果、野生型では S 期中期にセントロメア周辺ヘテロクロマチン領域に局在したが、低メチル化処理細胞ではどの時期でも局在し、低メチル化によるこの領域の爆発的転写を支持するクロマチン構造の変化をとらえることができた。さらに、染色体の安定性を調べるために、UHRF1-HaloTag

融合タンパク質発現ベクター (pFN21A UHRF1-HT)をベースに、さらに転写活性の弱いプロモーター下で UHRF1-HaloTag 融合タンパク質を発現できるベクター (pFN22K UHRF1-HT)を構築して発現させ、UHRF1 が発現している細胞では核の形態異常が観察され、発現レベルが高い程異常な核を持つ細胞の割合が高くなることを明らかにした。

(3) DNA メチル化基質の低下によって DNA 低メチル化が起こり、DNA 損傷が誘導されると推定して、葉酸欠乏条件下で細胞を培養し、DNA 損傷マーカーである -H2AX の免疫蛍光染色、および、bisulfite sequencing による特定ゲノム配列のメチル化状態の解析を行った。その結果、推定通りの機構で DNA 損傷が誘導されることが示唆された。

(4) 核内配置を制御する技術として、特定のゲノム配列を操作して欠失できる CRISPR/Cas9 システムの導入を検討した。ES 細胞において高い効率で数 kb から 500kb の領域を特異的に欠失させることに成功した。

(5) ゼブラフィッシュ由来培養細胞を用いて、細胞周期や核内複製動態と染色体上の複製部位の関係、複製フォーク速度を蛍光顕微鏡下に可視化・イメージングした結果、複製部位の核内配置は、哺乳類細胞に類似した 5 つのパターン(I~V)に分けられ、核全体に均一に観察されるパターン II が 60%以上という特徴を示した(図 1)。複製フォークの進行速度はヒト細胞と同等であることを初めて明らかにした。

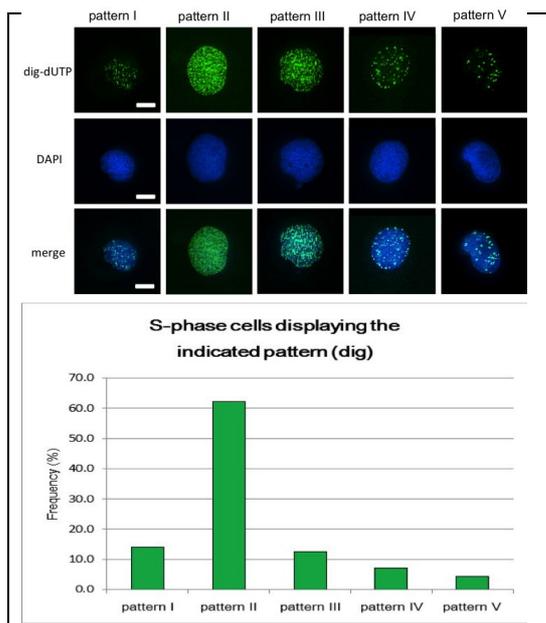


図1. ゼブラフィッシュ培養細胞 AB9 の核内複製 foci パターンの S 期進行に伴う変化 (上)細胞に 100  $\mu$ M dig-dUTP を取り込ませて複製標識し、固定・染色後の蛍光顕微鏡イメージ。複製 foci の局在の違いにより S-phase を pattern I-V に分類した。(下)上画像の pattern I-V の存在割合を示した。S 期の進行に伴い左から右に推移する。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) 奥村克純: "核マトリックスとゲノムダイナミクス" 生体の科学 62. 400-401 (2011), 査読無
- (2) 奥村克純: "核内ゲノムダイナミクスの可視化" 生体の科学 62. 500-501 (2011), 査読無

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) Kenji Kuriya, Eriko Higashiyama, Eriko Avsal, Yutaka Tamaru, Shin Ogata, and Katsuzumi Okumura: Molecular and Cellular Analysis Using Zebrafish Derived Cells. The Sixth International Workshop on Regional Innovation Studies (IWRIS2014), (2014/10/16-17) Mie University, Tsu
- (2) Yuta Minamigawa and Katsuzumi Okumura: The Lack of the Nutrition Ingredient Induces the DNA Damage. The Sixth International Workshop on Regional Innovation Studies (IWRIS2014), (2014/10/16-17) Mie University, Tsu
- (3) 東山恵理子, 栗谷健志, アヴシャル恵理子, 田丸浩, 緒方進, 奥村克純: ゼブラフィッシュ由来細胞を用いた DNA 複製の解析, 日本農芸化学会中部支部第 171 回例会 P26 p.15 (2014/10/11)名古屋大学 名古屋市
- (4) Katsuzumi Okumura: Epigenetic abnormalities: DNA damage induction by DNA hypomethylation and the nutritional connection. The 1st International Symposium for Bioengineering Research and Education (INSBIRE) (2014/8/4-5) La Jolla, USA
- (5) 生野彰宏, 吉村健, 緒方進, 奥村克純: 複製依存的 DNA 脱メチル化後の DNA 損傷誘導機構 -hairpin-bisulfite sequence 法によるヘミメチル化レベル解析-, 日本生化学会中部支部第 77 回例会・シンポジウム抄録集 P-81 (p92) (2014/5/24) 名古屋大学 名古屋大学野依記念学術交流会館 名古屋市
- (6) 柴田隆豊, 吉村健, 栗谷健志, 緒方進, 奥村克純: DNA 脱メチル化に伴う DNA 損傷機構へのヘミメチル化 DNA 結合タンパク質 UHRF1 の関与, 日本生化学会中部支部第 77 回例会・シンポジウム抄録集 P-79 (p90) (2014/5/24) 名古屋大学 名古屋大学野依記念学術交流会館 名古屋市
- (7) 村林雄太, 金岡秀明, 栗谷健志, 緒方進, 奥村克純: DNA 低メチル化に伴う DNA 損傷誘導機構について -DNA メチル化

阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine 処理による DNMT1 の減少-, 日本生化学会中部支部第 77 回例会・シンポジウム抄録集 P-80 (p91) (2014/5/24) 名古屋大学 名古屋大学野依記念学術交流会館 名古屋市

- (8) 奥村克純, 栗谷健志, 生野彰宏, 吉村健, 来馬 啓介, 伊藤 克: "受動的 DNA 脱メチル化に伴う DNA 損傷誘導機構の解明" 日本農芸化学会 2014 年度大会. (2014/03/27-30). 明治大学生田キャンパス 川崎市
- (9) 栗谷健志, 来馬啓介, 吉村健, 奥村克純: "DNMT1 減少時における DNA 損傷及び複製フォーク停止機構" 第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会. (2013/11/25-27). ホテルおかだ 足柄下郡箱根町
- (10) 生野彰宏, 吉村健, 奥村克純: "複製依存的 DNA 脱メチル化後の DNA 損傷機構 hairpin-bisulfite sequence 法によるヘミメチル化レベル解析" 日本生化学会中部支部例会. (2013/05/25). 名古屋大学 名古屋市

〔その他〕

ホームページ:

<http://kyoin.mie-u.ac.jp/profile/1637.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥村 克純 (OKUMURA KATSUZUMI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授

研究者番号: 30177183