

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651065

研究課題名(和文) 検証型エピジェネティック毒性研究実現のための特異的DNAメチル基導入技術の開発

研究課題名(英文) The development of a new technique to add DNA methylation on the target DNA sequence for the realization of epigenetic toxicity analysis of validation type.

研究代表者

五十嵐 勝秀 (Igarashi, Katsuhide)

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究者番号：30342885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：化学物質の遅発毒性のメカニズムとして注目される「エピジェネティック毒性」研究を発展させるために、狙ったDNA配列のDNAメチル化を操作する技術の開発に取り組んだ。ゲノム編集技術として実用化が進んだ「DNA結合タンパク質-ヌクレアーゼ」技術を応用した。その際、DNAメチル化操作がPCR技術並みに特異的に行われる工夫を施したアイデアを盛り込んだ。培養細胞を使って技術の検討を進め、予備的ながら開発に目処がつくデータを得た。

研究成果の概要(英文)：To advance the research for "epigenetic toxicity", which is thought to be the mechanism for the delayed toxic effects of chemicals, a new technique for editing DNA methylation on the target DNA sequence was tried to develop in this study. For that, "DNA binding protein-nuclease" techniques which are in the stage of practical use, was applied. In addition, an original idea to achieve the specificity comparable to PCR technique was also applied. Though preliminary, data indicating the possibility for the successful development of the technique was obtained.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 放射線・化学物質影響科学

キーワード：トキシコロジー エピジェネティック毒性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティック毒性研究進展の遅れとその原因

DNA 配列を変化させずに DNA やクロマチンへの化学修飾を介して形質を変化させる「エピジェネティクス」が注目を集め、我々も「エピジェネティック毒性」の展開を図っているが、行き詰まりも感じた。現状を打破するには、見いだしたエピゲノム変化の毒性への関わりを検証する術を得る必要があった。本研究では、実用化が進んだ「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」技術を応用し、「特異的に DNA メチル基を導入する技術」を開発することとした。

(2) ジンクフィンガーヌクレアーゼ技術の応用が進まない理由

ジンクフィンガーヌクレアーゼは、任意のゲノム配列の特異的切断を介したゲノムの人為的編集を可能とする。ゲノム編集技術実用化の最大のポイントは、2量体化して初めて DNA 切断活性を持つ FokI を用い、2ヶ所の DNA 配列の同時認識に伴う DNA 切断酵素活性上昇を実現し、PCR 並の特異性を持たせることに成功したことである。一方で、ジンクフィンガーに DNA メチル化酵素を直接融合する「ジンクフィンガー-DNA メチル化酵素」という単純な発案が我々以前に試行されたが、単量体でも弱い活性を持つ DNA メチル化酵素の特性のため、非特異的な DNA メチル基付加が無視できず、実用化は難しいとされていた (*Nucleic Acids Res.* 2010 38:1749-1759.)

(3) 発想の転換による実用化へのチャレンジ

エピゲノムを人為的に操作する技術は期待に反し開発が遅れており、それがエピジェネティック毒性研究の進展を妨げていた。

本研究では、特異性を上げられないことが開発の遅れの最大の原因であると捉え、「2ヶ所の DNA 配列の同時認識による内在性 DNA メチル化酵素の特異的リクルートと2量体化による活性上昇の誘導」という斬新なアイデアを提案し、問題解決を図ることとした。これにより PCR 並の特異性実現を試みた。

本研究の成功の鍵は、内在性の DNA メチル化酵素の特異的リクルートと活性化をいかに達成するかである。そのために我々は、内在性の DNA メチル化酵素を制御する因子を精査し、結合に伴い DNA メチル化酵素の2量体化および活性化を引き起こすタンパク質として、DNMT3L が適することに気づいた。DNMT3L を内在性の DNMT3a または DNMT3b を引き寄せる「ノリ」に使い、特異性問題を解決できる可能性を考えた。

ジンクフィンガーヌクレアーゼでは、2量体化して活性を持つ FokI の活用が成功のポイントであった。一方、単量体でも弱い活性

を持つ DNA メチル化酵素は、融合したジンクフィンガーの非特異的 DNA 結合に伴い、非特異的 DNA メチル化を引き起こしてしまう。PCR でいえば、片方のプライマーのみで非特異的に結合した DNA を増幅してしまうようなものである。

そこで原点に立ち返り、細胞内在性の DNA メチル化酵素の制御について明らかになっていることを整理した結果、細胞内在性 DNA メチル化酵素のうち、新規にメチル基を付加する酵素である DNMT3a および DNMT3b が、酵素活性を持たない補助タンパクである DNMT3L と結合した場合に2量体化し、酵素活性が格段に上昇することが報告されていることに気づいた (*Nature* 2007 449, 248-251; *J Biol Chem.* 2005 280,13341-13348)。すなわち、内在性の DNMT3a もしくは DNMT3b を DNMT3L に結合し目的 DNA 配列にリクルートすれば、酵素活性が上昇し特異性の高い DNA メチル化を誘導することが可能になると考えた。

(4) 内在性 DNA メチル化酵素の制御の仕組みの活用という発想

本研究で提案した技術では、配列の特異性を2種類のジンクフィンガータンパク質を用いた2ヶ所の DNA 配列の同時認識により担保する。融合した DNMT3L を足場に、内在性の DNMT3a もしくは DNMT3b をリクルートし、2量体化することで酵素活性が格段に上昇し、特異的な DNA メチル化が生じることを期待する。これは現時点で我々のみの独自のアイデアであることに加え、細胞が元々持っている制御の仕組みを活用することから実現の可能性が高いと考えた。

## 2. 研究の目的

化学物質のエピゲノム作用により遅発毒性が生じる「エピジェネティック毒性」が注目されているが、研究の進展は遅れていた。その原因として、エピゲノムを配列特異的に操作する技術が無く、検査研究にとどまらざるを得ないことが上げられた。本研究では、エピゲノムのうち DNA メチル化を取り上げ、「ゲノム上の任意の配列に対し特異的に DNA メチル基を導入する技術」を開発し、エピジェネティック毒性研究を検証型ヘシフトさせることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ジンクフィンガー-DNMT3L のアイデアを検証するために、マウス神経幹細胞における GFAP 遺伝子の DNA メチル化による発現制御系を用い、GFAP プロモーターの特異的な高メチル化誘導を目指したジンクフィンガー-DNMT3L の設計と検証を行うこととした。以下の各ステップを行った。

- 1) GFAP プロモーター特異的ジンクフィンガー-DNMT3L 発現ベクター設計・作製
- 2) 神経幹細胞へのベクター導入によ

る GFAP プロモーター標的配列近傍へのジンクフィンガー-DNMT3L 結合の確認

3) GFAP プロモーター高メチル化誘導に伴う GFAP 発現低下の確認

#### 4. 研究成果

1) GFAP プロモーター特異的 TALE-DNMT3L 発現ベクター設計・作製

(\*本研究では当初、DNA 結合タンパク質として、ジンクフィンガーを用いることとしていた。しかし、ゲノム編集のツールの一つとして TALE タンパク質のシステムが開発され、それはジンクフィンガータンパク質に付随する設計の難しさを克服したシステムであったため、本研究でも TALE に切り替えることとした。)

マウス GFAP 遺伝子は、転写開始点上流約 1.5kb に存在する STAT3 結合配列中に CpG 配列を持ち、その C がメチル化されていると STAT3 が結合できず、転写されないことが明らかになっている (*Dev Cell.* 2001 1, 749-758.)。その C はマウス胎生 11 日時点ではメチル化されているが、その後徐々に脱メチル化が進み、胎生 14 日ではメチル化程度が 40%程度まで低下し、培養を経るとほぼ 0% になることを我々も確認している (*Neuroscience.* 2008 155, 780-788.)。

そこで、この STAT3 結合配列を挟み特異的に結合する TALE タンパクをコードする DNA 配列を設計し(図 1) DNMT3L と融合した形で発現するベクターを作製する。DNMT3L は C 末側が DNMT3a および DNMT3b との結合を担う領域であるとの報告があるので、C 末側を用いることを基本とする。

TALE タンパク質の設計は、認識させる DNA 配列に対応する TALE モジュールのルールに関する情報を用いることとしたが、本研究ではその点も含めて受託合成を依頼した。なお、導入した TALE-DNMT3L を特異的に検出可能とするために、ペプチドタグとして FLAG が N 末に発現されるようにした。

```
GCCAGGCCCTTGTCTGTAAGCTGAAGACCTGGCAGTGTCTGAGCTGGTCAGCCCCCAGG
ACCTCCTTTTGTGCCACAGAGTGACTACCTTGGCATAGACATAATGGTCAGGGGTG
GGCACCGCAGCCTGCTTCCCCTGTCTCCAGGCCTCCTTCGATGCTTCCGAGAAAT
CTATTGAGCTGGGAGCTGTACTGCACCCGGGGCTGACATCCTGGCATCCTGGGATA
AAAGCAGCCCCAGGGGCTGCCCTTGCCATATGCCTCACTGGCGGCAGAGAAAGAGC
TCTATTACGCGAGTACCCTGGAGTAGACACCAGAAAGCCAAAGCATGGGCAGGGAAG
GCAGGGTTGGGG
```

STAT3結合配列

TALE1標的配列 [AGCCTGCTTCCCCTGTCTCCAG](#)

TALE2標的配列 [GAGCTGTACTGCACCCGGGGCTGA](#)

図1. GFAP promoter上のTALE標的配列の設定

2) 神経幹細胞へのベクター導入による GFAP プロモーター標的配列近傍への TALE-DNMT3L 結合の確認

GFAP 遺伝子の DNA メチル化による発現制御が明確なマウス胎児神経幹細胞の培養系を用い、培養を経てメチル化率が 0% になっている細胞 (NS cell) に TALE-DNMT3L 発現ベクターを導入した。TALE-DNMT3L の発現をウ

エスタンプロット法で確認した後、導入した細胞における GFAP プロモーター標的配列近傍への TALE-DNMT3L 結合を、FLAG に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降によって検討した(図 2)。その結果、TALE-DNMT3L 導入群で結合が認められ、2 種類の TALE-DNMT3L を導入した群で特に結合が強くなっていることを確認した。

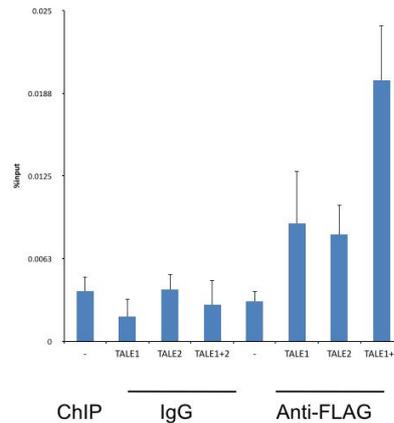


図2. TALE-DNMT3Lの標的DNA配列への結合確認

3) GFAP プロモーター高メチル化誘導に伴う GFAP 発現低下の確認

図 3 のような実験系を用いて本技術の検証を行った。すなわち、GFAP プロモーターの STAT3 結合配列が完全に DNA 脱メチル化されている NS cell を用いた。NS cell では、LIF 刺激に応じて細胞内で転写因子 STAT3 が活性化され、GFAP promoter に結合し、GFAP mRNA の発現を上昇させる。この NS cell に TALE-DNMT3L を発現させ、もし予定通り DNA メチル化が亢進した場合に、LIF による GFAP 誘導が低下する、という検証系である。

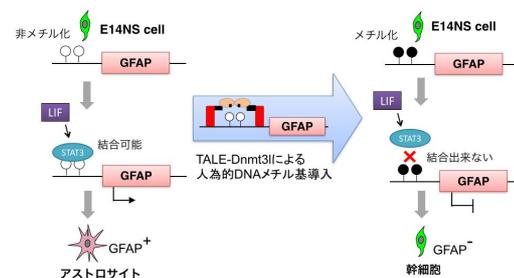


図3 人為的DNAメチル基導入法の検証

その結果、図 4 に示したように、LIF 濃度に応じた GFAP mRNA 誘導が TALE-DNMT3L 導入により抑制される結果が得られた。抑制の程度は 3 割程度であるが、これは発現ベクターの導入効率が約 3 割にとどまることを踏まえると予定の範囲であると考えられた。

以上から、本研究により、TALE-DNMT3L を用いた内在性 DNMT3A または 3B のリクルート

による DNA メチル化亢進が可能であることを示唆する結果が得られた。研究期間途中でシステムの変更（ジンクフィンガーから TALE へ）を行ったため、当初予定以上の成果を上げることは出来ていないが、本研究で提案したアイデアの実現性は高まったものと考ええる。今後、本研究で得た結果を生かし、技術の確立を行っていきたい。

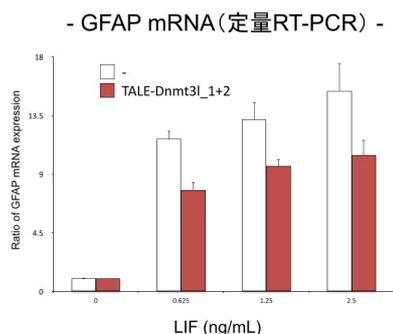


図4 TALE-Dnmt3l導入によるLIF応答(GFAP発現誘導)低下

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

五十嵐 勝秀、大塚 まき、中島 欽一、成田 年、DNMT3L 部分配列を用いた人為的DNAメチル化亢進技術開発の試み、第8回日本エピジェネティクス研究会、2014.5.27、東京

五十嵐 勝秀、富永 貴志、古川 佑介、大塚 まき、森山 紀子、菅野 純、種村 健太郎、化学物質と神経回路再編成(行動からエピジェネティクスまで)、Neuro2013(招待講演)、2013.6.22、京都

五十嵐 勝秀、種村 健太郎、古川 佑介、大塚 まき、森山 紀子、相崎 健一、北嶋 聡、菅野 純、脳発達期におけるGABAシグナルの一過性活性化による遅発中枢神経系影響の解析、第40回日本毒性学会、2013.6.17、千葉

〔図書〕(計1件)

五十嵐 勝秀、メディカルドゥ、エピジェネティクスと病気、2013年、280ページ(142-147)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

五十嵐勝秀 (IGARASHI, Katsuhide)

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究者番号：30342885

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし