

平成30年 6月13日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250038

研究課題名(和文) CRISPRを利用したエピゲノムの読み出しと書き込み

研究課題名(英文) CRISPR-mediated reading and writing of the epigenome

研究代表者

伊藤 隆司 (Ito, Takashi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：90201326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 23,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は、環境の変化に応じてDNA配列を変えずにゲノムの使い方を覚えて、そのパターンを細胞分裂後も安定に継承する。この仕組みをエピジェネティクスと呼ぶが、その分子機構はクロマチンを構成するDNAとタンパク質の修飾であり、その全貌をエピゲノムと称する。次世代シーケンシング技術によって可能になったエピゲノム解析技術にCRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を応用すると、ゲノム中の特定領域の修飾状況を読み出すことや、標的領域のエピジェネティクスを書き換えたり、生きた細胞の中で視覚化することも可能になる。本研究ではこれらの新しいエピゲノム研究手法のための基礎技術の開発を行なった。

研究成果の概要(英文)：The cell responds to environmental changes by altering its genome expression pattern, but not the genome sequences per se, and inherits the pattern even after cell division. This mechanism is called epigenetics, which is based on various chemical modifications of DNA and proteins comprising the chromosomes, and the term epigenome indicates the genome-wide pattern of these epigenetic modifications. It becomes increasingly possible to read, write, and visualize the epigenetics of targeted genomic regions by combining the technologies of CRISPR/Cas9-based genome editing and the next-generation DNA sequencing. In this study, we have developed basic methods for these novel approaches in epigenomics.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：エピゲノム ゲノム編集 次世代シーケンシング CRISPR/Cas9 dCas9 DNAメチル化 BiFC

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) エピゲノム解析の発展

エピジェネティクスとは、環境や内因性のシグナルに応じて同一のゲノムを多様なパターンに読み分け、更にそのパターンを安定に保持・継承する機構である。エピジェネティクスは細胞分化や環境応答をはじめとして広範な生命現象を制御するので、その異常は必然的に多種多様な病態と密接に関わる。エピジェネティック制御の中核をなす分子機構は、DNAメチル化とヒストン修飾である。その状況をゲノムワイドに把握するのがエピゲノム解析であり、次世代シーケンサ(NGS)の登場によって飛躍的な進展を遂げつつあり、米国がいち早く NIH Roadmap Epigenomics Program を開始したのに続き、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム(IHEC)も発足する等、ヒトの標準エピゲノムデータの取得を目指した活動が始まっていた。

### 2) エピゲノム解析の壁

エピゲノムは、ゲノムと対照的に細胞種によって異なり、同じ細胞種であっても細胞の状態によって変化する。したがって、解析には純化した細胞集団が必要となる。しかしながら、エピゲノム解析の標準手法である全ゲノムバイサルファイトシーケンス法(WGBS)とクロマチン免疫沈降シーケンス法(ChIP-Seq)は、哺乳類の場合、100万個前後の細胞が解析に必要とされていた。そのため、哺乳類卵・初期胚・組織幹細胞はもとより、健常なヒトの各種細胞であってもその収集が困難ないし不可能な場合も少なくない。この状況が IHEC における標準エピゲノムデータ取得上の障壁となっており、微量細胞からエピゲノムを決める技術が切実に求められていた。

また、エピジェネティック修飾は、それぞれが単独で機能するものではなく、機能的な相互作用を介してその効果を発揮する。したがって、あるゲノム座位に着目した場合、どの修飾とどの修飾が共起或いは相反するのかを把握する、つまりゲノム軸に対して垂直方向に各種エピジェネティック修飾のデータを統合する必要がある。そのためには、同一試料から複数の修飾情報を同時に読み出すのが理想的であるが、そのための技術開発は未開拓のままに残されていた。

同様に、ゲノム上のどの部位とどの部位のエピジェネティクスが協調して変化するかを把握すること、つまりゲノム軸に沿った水平方向のデータ統合も必須である。更に生殖細胞以外のヒト細胞が二倍体であり、X染色体不活化やゲノムインプリンティングのみならず配列に依存したアレル特異的エピジェネティック修飾が広汎に存在することも考慮すると、エピジェネティック修飾をアレル別に見分ける、つまり1分子解像度を持つことが重要である。これは言わばエピハプロタイプを明らかにすることであり、そのた

めの技術の開発も遅れていた。

以上の3点、つまり微量試料からの解析・解析の多重化・一分子解像度の取得が、今後のエピゲノム解析における技術的課題として残されている。

### 3) エピゲノム解析の先にあるもの

エピゲノムデータの蓄積とともに、様々な事象と相関を示すエピゲノム変化が見出されてくる。しかし、相関を越えて深い理解に踏み込むには、その変化を人為的に誘導して、それが細胞に対して及ぼす影響を検証する必要がある。つまり、遺伝学における部位特異的変異導入によるゲノム改変に相当するエピジェネティクスの研究手法 - 部位特異的エピ変異導入 - を確立せねばならない。そうした手法は、基礎研究のみならず治療等の応用にもつながるものである。

部位特異的なエピジェネティック修飾導入は、転写因子を利用して修飾酵素をゲノム中の特定部位にリクルートすることで行われてきた。しかし、こうした実験が可能なのは、特定部位に転写因子の認識配列を容易に挿入できる生物や細胞に限られる上に、その挿入が及ぼす影響への懸念を払拭できないという問題点を抱えてきた。しかし、TALE や CRISPR/Cas9 などの配列特異的 DNA 結合タンパク質を設計する技術が飛躍的に進展し、これらを応用してゲノムを改変することなく修飾酵素を特定部位にリクルートする研究が一気に加速を見せ始めていた。

## 2. 研究の目的

1) エピゲノムを読み出す技術として我々が独自に開発してきた世界最高感度のバイサルファイトシーケンス技術 Post-Bisulfite Adaptor Tagging 法(PBAT)について、高度化を図る。

2) CRISPR/Cas9 を用いて部位的なエピジェネティック変化を誘導する。

3) CRISPR/Cas9 を用いて部位的なエピジェネティック変化を視覚化する。

## 3. 研究の方法

1) PBAT 法の高度化については、ランダムプライミングを用いないプロトコルの開発を試みる。

2) DNA 切断能を失った Cas9 の変異体 dCas9 を用いて、出芽酵母をモデルにヒストン修飾の変化誘導を試みる。

3) dCas9 を用いてエピジェネティック変化を生細胞視覚化するために、dCas9 に基づく蛍光二分子補完法(BiFC)を試みる。

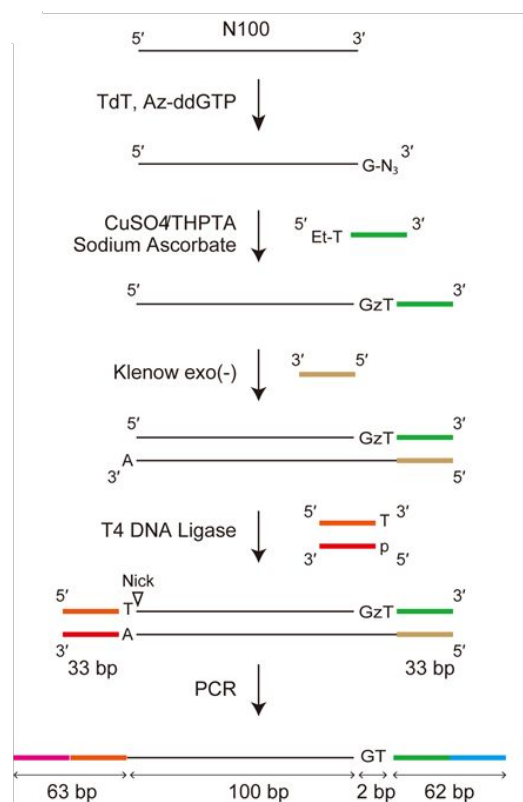
## 4. 研究成果

1) ランダムプライミングによらない PBAT の開発

ランダムプライミングを用いる現行 PBAT 法の欠点を解消するために、バイサルファイト変換済1本鎖DNAへのアダプター付加法に

ついて検討を加えた。まず、当初計画していたランダム配列からなる 5' 突出末端を有する 2 本鎖アダプターを T4 DNA リガーゼで連結させる方法について、モデルオリゴヌクレオチドへの高い連結を確認した。

しかしながら、その過程において、全く新しい原理による以下の方法の着想を得た。この方法では、まず ssDNA の 3' 末端に Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を用いて 3' -azido-dGTP を付加する。次に、こうして 3' 末端に付加されたアジド基に対して、クリックケミストリー (copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition; CuAAC) を用いて、5' -エチニル化オリゴヌクレオチドを効率的に連結する。その結果生じるトリアゾール連結部については、DNA ポリメラーゼによって相補鎖を形成できることが示唆されていることから、実現性が高いと考えられた。この方法を TdT-assisted, CuAAC-mediated ssDNA ligation (TCS ligation) と名付けた。各要素反応の最適化を進めて、それぞれが効率よく進むことを確認した上で、モデルオリゴヌクレオチドおよび MNase 消化断片を対象に NGS ライブラリの作成を行って、TCS ライゲーション法の原理証明に成功した (下図)。



## 2) 部位特異的エピ変異導入

DNase 活性を消失した Cas9 変異体 dCas9 に DNA やヒストンの修飾酵素を連結したものを発現させて部位特異的エピ変異導入を目指す。そのための基礎条件検討として、dCas9-GFP を出芽酵母の rRNA 遺伝子座位にターゲティングすることを試みた。しかしながら、期待された核小体蛍光シグナルの増強が認められなかったため、sgRNA の発現とプロ

セシング、および Cas9 による in vitro 標的切断を行う実験系をそれぞれ構築して評価を行った。その結果、sgRNA については問題がなかったものの、Cas9 自身に核小体に集積する性質があることが判明した。

そこで計画を変更して、野生株において 14 コピーのタンDEMリピートを成す CUP1 遺伝子座位を標的として検討を行った。CUP1 遺伝子に対する様々な sgRNA を設計して dCas9-Venus と共発現させたところ、核内の一点に蛍光シグナルの集積を認めた。銅の添加によって CUP1 遺伝子プロモーターにリクルートされる転写因子 CUP2 に RFP を融合した CUP2-RFP と dCas9-Venus を共発現する株を作成して銅を添加したところ、核内の Venus の輝点に RFP が集積することが観察されて、dCas9-Venus が正しく標的遺伝子 CUP1 座位を視覚化できていたことが確認できた。そこで、dCas9 にヒストンアセチル化酵素 p300 のコア部分を付加した dCas9-p300 を、視覚実験で有効性が確認された sgRNA とともに発現する cup2 欠損株を作成した。cup2 欠損株は CUP1 遺伝子の誘導が起らないので銅感受性を示すが、dCas9-p300 を遺伝子体部ではなくプロモーターにリクルートすると銅感受性が部分的に抑圧された。この結果は、プロモーターのヒストンアセチル化亢進によって CUP1 遺伝子の基底発現レベルが上昇したものと考えられた。

## 3) エピジェネティック修飾の部位特異的生細胞可視化

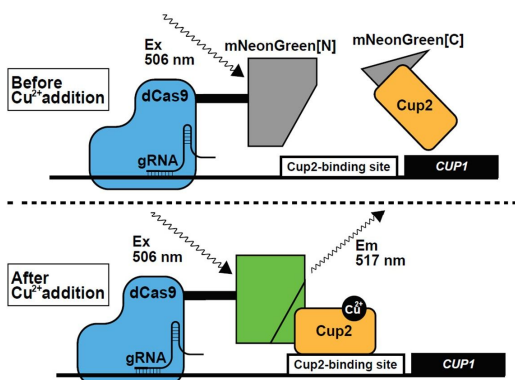
dCas9 による CUP1 遺伝子座位の可視化に成功したので、その周辺のエピジェネティック修飾変化の生細胞可視化を計画した。そのために、輝度と光安定性の双方に優れた monomeric NeonGreen (mNG) について、Net1 と Sir2 の相互作用をモデルに、二分子蛍光相補に最適な切断点を同定した。

その性能を検討するため、mNG の BiFC を細胞内存在量が 32 分子に過ぎない出芽酵母セントロメア特異的ヒストンバリエーション Cse4 に適用したところ、タイムラプス観察が可能な感度を持つことが示された。

次に、ゲノムの特定座位へのタンパク質結合を BiFC で検出するために、rRNA 遺伝子中の Fob1 結合部位周辺にリクルートした dCas9 と Fob1 の間での BiFC を試みて、その検出に成功した。これにより、ゲノム DNA とタンパク質間の静的な相互作用の生細胞視覚化がかなうことが実証できた。

更に、CUP1 遺伝子プロモーターにターゲティングした dCas9 と CUP2 間の BiFC を検討した。当初、CUP2-mNG 融合タンパク質の局在異常等のトラブルが生じたが、株の変更で問題を解決できた。その結果、銅の添加によって dCas9-CUP2 間の BiFC が特異的に誘導されることが確認できた。これにより、dCas9 を利用して特定のゲノム座位へのタンパク質の結合という動的プロセスを BiFC によって生

細胞観察できることが実証された(次頁図、投稿準備中)。



## 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 8件)

Fumihito MIURA, Tomoko FUJINO, Kanako KOGASHI, Yukiko SHIBATA, Miki MIURA, Hiroyuki ISOBE & Takashi ITO

Triazole linking for preparation of a next-generation sequencing library from single-stranded DNA.

Nucleic Acids Research、査読有、46巻、2018、Epub ahead of print

DOI: 10.1093/nar/gky452

Fumihito MIURA & Takashi ITO

Post-Bisulfite Adaptor Tagging for PCR-Free Whole-Genome Bisulfite Sequencing.

Methods in Molecular Biology、査読有、1708巻、2018、123-136

DOI: doi: 10.1007/978-1-4939-7481-8\_7.

Tsukasa SANOSAKA, Takuya IMAMURA, Nobuhiko HAMAZAKI, MuhChyi CHAI, Katsuhide IGARASHI, Maky IDETA-OTSUKA, Fumihito MIURA, Takashi ITO, Nobuyuki FUJII, Kazuho IKEO, & Kinichi NAKASHIMA  
DNA Methylome Analysis Identifies Transcription Factor-Based Epigenomic Signatures of Multilineage Competence in Neural Stem/Progenitor Cells.

Cell Reports、査読有、20巻、2017、2992-3000

DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.086.

Hidehiro TOH, Kenjiro SHIRANE, Fumihito MIURA, Naoki KUBO, Kenji ICHIYANAGI, Katsuhiko HAYASHI, Mitinori SAITOU, Mikita SUYAMA, Takashi ITO, & Hiroyuki SASAKI

Software updates in the Illumina HiSeq platform affect whole-genome bisulfite sequencing.

BMC Genomics、査読有、

18、2017、31

DOI: 10.1186/s12864-016-3392-9.

Tasuku KOIKE, Takuya WAKAI, Yuko JINCHO, Akihiko SAKASHITA, Hisato KOBAYASHI, Eiji MIZUTANI, Sayaka WAKAYAMA, Fumihito MIURA, Takashi ITO, & Tomohiro KONO

DNA Methylation Errors in Cloned Mouse Sperm by Germ Line Barrier Evasion.

Biology of Reproduction、査読有、

94巻、2016、128

DOI: 10.1095/biolreprod.116.138677.

Takao YOKOYAMA, Fumihito MIURA, Hiromits ARAKI, Kohji OKAMURA, & Takashi ITO

Change-point detection in base-resolution methylome data reveals a robust signature of methylated domain landscape.

BMC Genomics、査読有、

16巻、2015、594

DOI: 10.1186/s12864-015-1809-5.

Jack M COLICCHIO, Fumihito MIURA, John T KELLY, Takashi ITO & Lena C HILEMAN

DNA methylation and gene expression in *Mimulus guttatus*.

BMC Genomics、査読有、

16巻、2015、507

DOI: 10.1186/s12864-015-1668-0.

Fumihito MIURA & Takashi ITO

Highly sensitive targeted methylome sequencing by post-bisulfite adaptor tagging.

DNA Research、査読有、

22巻、2015、13-18

DOI: 10.1093/dnares/dsu034.

[学会発表](計 3件)

Satoshi OKADA, Shitomi NAKAGAWA, Seiya KAMINO & Takashi ITO

Development of BiFC system based on a bright and photo-stable fluorescent protein for detecting a limited number of protein-protein interactions.

ASCB/EMBO 2017 Meeting

伊藤 隆司

次世代シーケンシングによる高感度一塩基解像度メチローム解析

第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2015)

伊藤 隆司

PBATによる高感度メチロームシーケンシング

第42回日本毒性学会

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 隆司 (ITO, Takashi)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：90201326

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

三浦 史仁 (MIURA, Fumihito)  
九州大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：50447348

岡田 悟 (OKADA, Satoshi)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：30734488