

DNAメチル化レベルの変動に着目した新規老年病モデルの確立  
(28-35)

主任研究者 坂口 和弥 国立長寿医療研究センター 流動研究員

研究要旨

老化に伴う機能低下や疾患を予防・治療する方法の開発は、超高齢化社会を迎えた我が国における重要な課題である。ヒトの DNA メチル化レベルが加齢に伴い変動すること (Weidner et al., *Genome Biology*, 2014)、アルツハイマー病の脳においても DNA メチル化レベルが変動することが報告されている (Lord and Cruchaga, *Nature Neuroscience* 2014)。これらの報告からヒントを得て、加齢に伴う疾患のメカニズムを明らかにするために、DNA メチル化レベルの変動に着目した新規のモデル動物を作製するアイデアを得た。老化は全身で起こる現象なので、老年病に対する DNA メチル化レベル変動の関与を知るためには、個体レベルの解析が有用である。ゼブラフィッシュは遺伝的操作や、一度に多量の個体を飼育することが容易なモデル動物である。これまでに所属研究部では、ゼブラフィッシュの加齢に伴う、DNA メチル化レベルの変動を明らかにしてきたが、この数年間で普及したゲノム編集技術を用いる事により新しい切り口で老化・老年病研究ができると考えた (図 1)。予備実験で活性が確認された DNA メチル基転移酵素 (*dnmt3*) のゼブラフィッシュ変異体を樹立することにより、全身の DNA メチル化レベルを操作する。この動物を利用して、老年病における DNA メチル化レベル変動の役割を明らかにする。また、作製した動物のトランスクリプトーム解析を実施して、老年病関連遺伝子が変動するのかを網羅的に解析する。

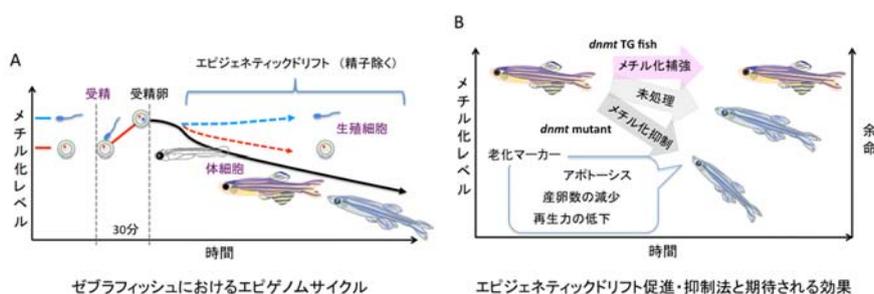


図 1 概念図

- A) 加齢に伴い全身のメチル化レベルは低下する傾向にある。
- B) 個体のメチル化を操作した動物をつくり、加齢への影響を調べる。

主任研究者

坂口 和弥 国立長寿医療研究センター 流動研究員

## A. 研究目的

加齢に伴う疾患の本態を解明する事を目的として、DNA メチル化レベルの変動に着目した新規老年病モデルの構築を行う。

そのために、ゼブラフィッシュで DNA メチル化を触媒する *de novo* 型酵素として知られる DNA メチル基転移酵素 (*dnmt3*) の変異体を作成することにより、全身の DNA メチル化レベルを操作した動物を樹立する。その動物を解析することにより、老年病における DNA メチル化レベル変動の役割を明らかにする。また、作製した動物のトランスクリプトーム解析を実施して、老年病関連遺伝子の変動するのかを網羅的に解析する。

DNA メチル化レベルの変動と加齢との関連を明らかにして、老年病早期診断法の開発につながる基礎的なデータを得る。作製したモデルにおいて老年病関連遺伝子の DNA メチル化レベルの変動と老年病発症との関係を明らかにすることができれば、発症の早期予測の可能性が開かれる。また、モデルを使用した創薬スクリーニングシステムの確立も期待される。

## B. 研究方法

### 動物の作製

CRISPR/Cas9 によりメチル基転移酵素 *dnmt3* (Ensembl Gene ID ENSDARG00000057830) の破壊を行った (図 2)。DR274 ベクターに sgRNA 配列を組み入れたプラスミドを作製して AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit(Epicentre)により sgRNA を合成した。ヒト型 Cas9 の mRNA は mMessage mMachin Kit(Thermo Fisher Scientific)により合成した。各 RNA は 1-2 細胞期の受精卵に導入した。HMA (Heteroduplex Mobility Assay) 法による遺伝型決定は AmpliTaq Gold(Thermo Fisher Scientific)によりサイクル数 40, アニーリング温度 55°C で増やした産物を、PAGE(10-20% or 15-20% 勾配ゲル)で流してバンドの移動度を測定することによって行った。

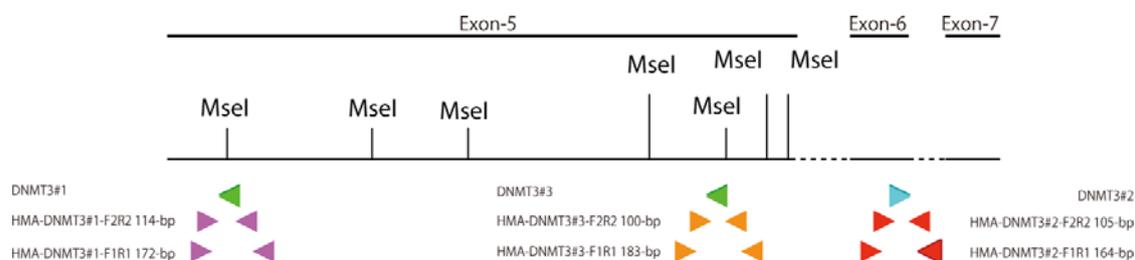


図 2: *dnmt3* ターゲット配列の設計

DNMT3#1, 2, 3 までのターゲット配列と対応する HMA のプライマーを設計した。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理・利益相反委員会に申請が必要な内容を予定していない。組換え DNA 実験については遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受けた上で実施した。動物実験については動物実験委員会の必要な承認を受けた上で実施した。

## C. 研究結果

CRISPR/Cas9 導入動物の子世代より、HMA 法により候補を選択して、サンガー法によるシーケンスによって変異を確認したところ、sgRNA#2 部位で遺伝子が破壊された系統が複数得られた。予測と反して致死的表现型を示しておらず、また生殖可能であり、このまま維持が可能であると考えられる。そのため、当初検討していた強制発現系を作製しても効果の検証が難しいので、先行して表現型の解析を行っている。現在、細胞老化マーカーや骨格系の形態の変化を観察中である。

## D. 考察と結論

*dnmt3* 変異体動物の樹立にまでにいたって、戻し交配を進行中であり順調に進行している。今後、樹立した変異体について必要な情報を集積する。また、さらに解析して表現型を決定するとともに、個別の遺伝子でも同じ傾向が認められるかを確認する。

## E. 健康危険情報

なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- ① 坂口和弥, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義, アルツハイマー病の発症を血中 DNA のメチル化から予測する, 第 39 回日本基礎老化学会大会, 平成 28 年 5 月 27 日, 神奈川
- ② 坂口和弥, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義, 血中 DNA のメチル化を指標としたアルツハイマー病早期診断法の開発, 第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会, 大阪

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし