

DNA メチル化による老化制御のメカニズム解明 (19-42)

主任研究者 岩波 礼将 国立長寿医療研究センター再生再建医学研究部 (流動研究員)

研究要旨

加齢に伴いゲノム DNA のメチル化状態は領域特異的に徐々に変動するので老化の指標となりうる。また、変動したメチル化は受精直後に元の状態に戻ることから、DNA メチル化の加齢変動が寿命のタイマーである可能性が考えられる。しかし、DNA メチル化変動の老化における機能的な意義は知られていない。本課題では、加齢依存的メチル化変動ゲノム領域および DNA メチル化のリセットに関わる DNA メチル化酵素の特定を目指した。

哺乳動物においては2つの *de novo* DNA メチル化酵素のいずれもが正常発生に必要であり、メチル化標的ゲノム領域も広範であるため、DNA メチル化の老化における機能を明らかにするのは困難である。一方ゼブラフィッシュでは *de novo* DNA メチル化酵素が6つ存在し、それぞれが一部機能を重複分担していると期待された。そこで本課題では、ゼブラフィッシュで CRISPR/Cas9 システムにより *de novo* DNA メチル化酵素群を欠損させ、DNA メチル化状態の解析と老化表現型を観察し、メチル化のリセットおよび老化に関与する酵素の特定を目指した。老化が促進される変異体が見つければ、メチル化状態に老齢ゼブラフィッシュと共通した変化がみられるゲノム領域を特定し、その領域の遺伝子発現に変化が見られるかの解析を計画した。これらの解析により、DNA メチル化と老化の機能的関連性を明らかにすることを目指した。*in vivo* における DNA メチル化酵素の機能の網羅的解析は、国内外において類を見ない意欲的な取り組みであり、哺乳類で解決困難な課題に対してゼブラフィッシュモデルを用いて解決を試みる独創的なアプローチである。

当研究により DNA メチル化が老化に関わるゲノム領域を明らかにし、またメチル化リセットに関わる *de novo* DNA メチル化酵素を特定できれば、メチル化酵素の機能を人為的に操作することにより老化を制御することが可能になり、将来この知見をヒトに還元することで健康長寿の達成に大きく貢献できると期待される。

主任研究者

岩波 礼将 国立長寿医療研究センター再生再建医学研究部（流動研究員）

A. 研究目的

加齢に伴う DNA メチル化状態の変動は知られているが、その老化に与える影響は不明である。その関連を実証するためには、DNA メチル化が老化に直接影響を与えるゲノム領域を特定することと、そのメチル化を人為的に変化させることが必要である。当研究室では脊椎動物の加齢におけるメチル化の易変異性領域として「CpG アイランドショア」を同定しており、同領域のメチル化変動が老化の原因になるのではないかという仮説を立てている。加齢変動した CpG アイランドショアの DNA メチル化状態は受精直後にリセットされるので、これに関わる DNA メチル化酵素を特定し、その機能の人為的操作により CpG アイランドショアのメチル化レベルを変化させ、最終的に寿命を含めた老化表現型を変化させることができれば、DNA メチル化と老化の因果関係を明らかにしたと考えられる。この検証はおそらく哺乳類では困難である。なぜなら哺乳動物においては 2 つの *de novo* DNA メチル化酵素のいずれもが正常発生に必要であり、メチル化標的ゲノム領域も広範であるため、人為的 DNA メチル化変動が発生異常をもたらす可能性が高いからである。

そこで本課題ではゼブラフィッシュをモデルとして用いた。ゼブラフィッシュでは *de novo* DNA メチル化酵素が 6 つ存在し、それぞれが一部機能を重複分担していると期待された。実際これまでの当研究室および共同研究者の解析により、6 つのうち 2 つの酵素については欠損により寿命に異常が示されず、また初期胚におけるゲノムワイドなメチル化リセットの異常は見られなかった。そこで、老化に関わる DNA メチル化酵素はこれら以外か、あるいは複数の酵素のコンビネーションによって担われることが予測された。したがって、当課題においては残りのゼブラフィッシュメチル化酵素遺伝子を欠損させて CpG アイランドショアの DNA メチル化状態の解析と老化表現型を観察し、メチル化のリセットおよび寿命に関与する酵素の特定を目指した。

B. 研究方法

ゼブラフィッシュの 6 つの *de novo* DNA メチル化酵素遺伝子のうち 2 つについては当研究室および共同研究者により変異体を作成され、老化に顕著な影響を与えないことが分かっている。また別の 1 つについては別の研究グループにより変異体が多臓器不全により幼魚期に死ぬことが報告されている。そこで残りの 3 つの遺伝子について、欠損する変異体を CRISPR/Cas9 システムで作成した。それらの変異体系統を樹立し、ホモの変異体の表現型を解析した。致死の表現型を示さない変異体では、寿命等の老化表現型の観察を行うとともに、母性胚性変異体を作成し、初期胚における DNA メチル化状態のリセット異常

を探索した。変異体が組織特異的発生異常を示した場合には、トランスクリプトーム解析を行い、DNAメチル化の変化と発現変化が見られる遺伝子の中から表現型の責任遺伝子候補を選び出し、胚へのモルフォリノアンチセンスオリゴDNA注入によるノックダウン、mRNA注入によりもたらされる表現型を観察することにより責任遺伝子の特定を目指した。

(倫理面への配慮)

相手方の同意・協力を必要とする研究、個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究には該当しない。

組換えDNA実験および動物実験の遂行に際しては、法令および研究機関の規則に従って実験計画の申請手続きを適切に行った。組換えDNA実験に関しては遺伝子組換え実験に関する法律に従い、物理的、生物学的封じ込めにより実験従事者への伝播および外界への拡散防止に十分に心がけた。動物実験に関しては、必要最小限の個体を用い、できる限り苦痛を軽減するよう配慮した。

C. 研究結果

ゼブラフィッシュの6つの*de novo* DNAメチル化酵素遺伝子のうち、発生初期のゲノムDNAのメチル化状態リセットに関わる遺伝子を特定するために、まず各遺伝子の欠損系統の樹立を試みた。その結果、4つについてはCRISPR/Cas9システムにより変異体を作成し、2つについては共同研究者から変異体を取得することにより、全ての遺伝子の変異体を得た。そのうち、変異をホモで持つと血球分化異常を伴い生存率が低下することが他のグループにより報告されている*dnmt3bb.1*については独自に作成した変異体でも表現型が再現されるかどうか確認中であるが、他の5つの遺伝子についてはいずれも変異をホモで持つ個体が明確な発生異常を示さず、成体に成長することが分かった。このことは本研究開始時の想定通り、ゼブラフィッシュにおける*de novo* DNAメチル化酵素の部分的な機能重複分担を示し、母性効果が重要であると予想されるDNAメチル化状態のリセットに関わるメチル化酵素の特定に有用であることが明らかになった。

これまでに、*dnmt3aa*、*dnmt3ab*、*dnmt3ba*、*dnmt3bb.2*、*dnmt3bb.3*については母性胚性変異体胚においてもDNAメチル化状態のリセットが正常に起こることが分かり、*dnmt3bb.1*変異体については母性胚性変異体を得るための掛け合わせを進行中である。また老化表現型の有無を観察するために、母性胚性変異体の長期間の育成を進めている。

並行して、複数の酵素が分担してメチル化状態をリセットすることも想定し、複数の遺伝子の母性胚性変異体を得るための掛け合わせを進めている。その中で面白いことに、*dnmt3bb.2*と*dnmt3ba*の二重変異体では脊索発生異常の胚が高頻度に出現することが確認されつつあり、両遺伝子の変異により初期胚での部分的なリセット異常によるものでは

ないかと期待される。

また *dnmt3bb.2* 変異体に関しては、母性胚性変異体胚の whole genome bisulfite sequencing およびマイクロアレイにより、DNA メチル化変動の遺伝子発現における役割の解析を進めた。その結果、変異体においてジーンボディの DNA 低メチル化を示し、異所的に転写開始する転写産物の過剰発現が認められるアンジオポイエチン様遺伝子 *angptl1* を見出した。この変異体では *angptl1* 発現異常を介して一過的な血管形成異常と血流速度低下が観察された。これらの結果からジーンボディメチル化が *in vivo* において、遺伝子の適正な発現量および転写開始点の決定、さらには転写産物の integrity の担保に寄与することを明らかにした。また興味深いことに、母性胚性変異体胚に生じた *angptl1b* の低メチル化状態は野生型と交配しても次世代では元に戻らなかった。したがって *Dnmt3bb.2* の喪失によりもたらされるメチル化異常はトランスジェネレーショナルに遺伝することも明らかになった。現在、*angptl1b* の *in vivo* 機能解析を進めるとともに、メチル化異常の遺伝に関して 3 世代での確認を進めている。

このように、初期胚における DNA メチル化リセットに関わる DNA メチル化酵素遺伝子特定のための多重変異体作成と各変異体の表現型解析を進めている。

D. 考察と結論

本課題では引き続き *de novo* DNA メチル化酵素群を欠損したゼブラフィッシュ変異体のゲノム DNA のメチル化状態、初期胚におけるメチル化リセットの有無、老化表現型の有無の解析を進めている。先に述べたように単一の酵素遺伝子破壊では効果は見られていないが、二重変異体作成によりメチル化リセット効果の兆候が見られつつあるので、その他のコンビネーションの多重変異体を作成することにより、メチル化リセットに関わる酵素を特定できると考えられる。当研究によりメチル化リセットに関わる *de novo* DNA メチル化酵素を特定でき、また DNA メチル化が老化に関わるゲノム領域を明らかにできれば、メチル化酵素の機能を人為的に操作することにより老化を制御することが可能になり、将来この知見をヒトに還元することで健康長寿の達成に大きく貢献できると期待される。

仮にメチル化リセットが複数のメチル化酵素のコンビネーションによって行われ、それらの特定が困難であったとしても、これまでに申請者が取り組んできた DNA メチル化の組織特異的役割について明らかにできることが期待される。実際、*dnmt3bb.2* については既に *angptl1b* のジーンボディメチル化により、遺伝子の適正な発現量および転写開始点の決定、転写産物の integrity の担保に寄与し、初期胚における適切な血管形成に必要であることが明らかになり、血管内皮細胞と血球分化のマスター遺伝子として知られる *npas4l* に対する負の制御因子として *Angptl1b* を特定することに成功した。今後、ゼブラフィッシュにおいて機能分担していると考えられる *de novo* DNA メチル化酵素群の発

生、分化、老化における機能をつぶさに明らかにすることは、エピジェネティクス制御が遺伝子発現を介して生命現象を統御する過程の理解に役立つモデル動物を確立できる点で生物学的に大いに価値がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) A small fish model for quantitative analysis of radiation effects using visualized thymus responses in GFP transgenic medaka. Maruyama K, Iwanami N, Maruyama-Hayakawa T, Doi K, Wang B. Int J Radiat Biol. 95:1144-1149 (2019).

2) Evolutionary transition from degenerate to non-redundant cytokine signaling networks supporting intrathymic T cell development. Lawir DF, Hess I, Sikora K, Iwanami N, Siamishi I, Schorpp M, Boehm T. Proc Natl Acad Sci U S A. pii: 201915223 (2019)

3) Cytidine deaminase 2 is required for VLRB antibody gene assembly in lampreys. Morimoto R, O'Meara CP, Holland SJ, Trancoso I, Souissi A, Schorpp M, Vassaux D, Iwanami N, Giorgetti OB, Evanno G, Boehm T. Sci Immunol. pii: eaba0925 (2020).

2. 学会発表

1) ジーンボディにおける DNA メチル化の機能的役割 岩波礼将、横井勇人、秋山真太郎、重水大智、荒木夏生、二宮尚、松田勝、鈴木徹、下田修義 第13回日本エピジェネティクス研究会年会 2019年5月 横浜

2) De novo methylation of zebrafish angptl1b gene body by Dnmt3bb.2 secures the expression level and integrity of the transcript. Iwanami N, Yokoi H, Akiyama S, Shigemizu D, Araki N, Ninomiya N, Matsuda M, Suzuki T, Shimoda N. 第25回小型魚類研究会 2019年9月 宇都宮

3) Role of gene body methylation revealed by a viable zebrafish DNA methyltransferase mutant. Iwanami N, Yokoi H, Akiyama S, Shigemizu D, Araki N, Ninomiya N, Matsuda M, Suzuki T, Shimoda N. 日本分子生物学会年会 2019年12月 福岡

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