

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告（総合報告）

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 澤村 嘉代子 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

脊椎動物のゲノム DNA において“CpG”という並びにあるシトシン(C)の7割は DNA メチル基転移酵素(DNA methyltransferase; Dnmt)の働きによりメチル化を受けている（以下、DNA メチル化）。発生の初期にゲノムのメチル化パターンは概ね定まり、以降、成体から死に至るまで全体的には安定に維持されるが、局所的には加齢に伴いメチル化状態は緩徐に変化し、この現象はエピジェネティックドリフトと呼ばれている。DNA メチル化は遺伝子の活性を抑制する効果を持つため、エピジェネティックドリフトは加齢とともに遺伝子発現の制御が失われていくことを示唆する。このことからエピジェネティックドリフトは老化の主要な原因ではないかと推測されている。しかし DNA メチル化変動と老化の因果関係は未だ実証されていない。そこで本課題では、モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素活性を人為的に変動させることにより、老化表現型や寿命が変化しうるのかを検証する。また DNA メチル化の変動が遺伝子発現に与える影響を個体レベルで明らかにする。

DNA メチル化と老化の関連を調べるに当たり、本研究でゼブラフィッシュを実験材料に選んだのは、ゼブラフィッシュのエピジェネティックドリフトがマウスなどの哺乳動物におけるそれよりも単純であるからである。マウスでは加齢に伴いゲノム領域によりメチル化レベルが上がる場合と下がる場合があるのに対し、ゼブラフィッシュのゲノムでのエピジェネティックドリフトはメチル基の脱落のみである。そして受精後すみやかに、すなわち次世代の出発時に元の高メチル化状態に戻る（以降、この現象を「リセット」と記す）。そのためゼブラフィッシュでは、ゲノムのメチル化レベルを上げることで若返りに、下げることで老化に繋がるのが期待される。

ゼブラフィッシュのゲノムのメチル化レベルを変化させるには、リセットを担う酵素の同定が必要となる。脊椎動物の受精時にシトシンにメチル基を新たに付与する酵素が *de novo* 型 DNA メチル化酵素で、これは Dnmt3 と名付けられている。ゼブラフィッシュには Dnmt3 様タンパク質をコードする *dnmt3* のホモログが6つ存在する(*dnmt3aa, ab, ba,*

*bb.1, bb.2, bb.3*が、どの Dnmt3 タンパク質がリセットを担っているか、またそれは一つなのか複数なのかは明らかでない。そこで本課題では、まずゲノム編集技術を用いてゼブラフィッシュの6つの *de novo* 型 DNA メチル化酵素遺伝子をそれぞれ欠損させ、リセットに異常を来す変異体を同定することを第一の目標とした。そして、これらの変異体が胚性致死でなければ、個体を成長させて老化の表現型を解析する。次に、老化が亢進される変異体が見つかれば、原因となった DNA メチル化酵素を逆に高発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを作製し、老化が遅延するかどうかを検定する。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す。

本研究ではまた、エピジェネティックドリフトが遺伝子発現の制御にどのような影響を及ぼすのかについても解析する。具体的には、本研究で作製する *dnmt3bb.2* 変異体について全ゲノムメチル化解析とトランスクリプトーム解析を組み合わせることにより *Dnmt3bb.2* タンパク質が標的とする遺伝子を明らかにする。そしてこの標的遺伝子をエピジェネティックドリフトの「モデル遺伝子」と見なして、*dnmt3bb.2* 変異体におけるその標的遺伝子の発現を、発現量や転写開始点、スプライシング、転写産物構造の完全性 (integrity) などの視点から解析することで、エピジェネティックドリフトが遺伝子に何をもたらすのかを判断する。この知見は、高齢者特有の疾患の発症機序を理解することや、疾患のバイオマーカー探索に貢献すると期待される。

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)
(2019年度)

澤村 嘉代子 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)
(2020年度)

研究期間 2019年4月1日～2021年3月31日

A. 研究目的

脊椎動物のゲノム DNA における DNA メチル化は、加齢に伴いその状態が緩徐な変化をすることが知られており、この現象はエピジェネティックドリフトと呼ばれている。DNA メチル化は遺伝子の活性を抑制する効果を持つため、エピジェネティックドリフトは加齢とともに遺伝子発現の制御が失われていくことを示唆しており、このことからエピジェネティックドリフトは老化の主要な原因ではないかと推測することが出来る。しかし DNA メチル化変動と老化の因果関係は未だ実証されていない。

そこで本課題では、モデル脊椎動物であるゼブラフィッシュの DNA メチル化酵素活性を人為的に変動させることにより、老化表現型や寿命が変化しうるのかを検証し、老化に関与する DNA メチル化酵素の同定を目指した。また、高齢者特有の疾患のバイオマーカー検索への貢献が期待できるという観点から、エピジェネティックドリフトが遺伝子発現に与える影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

DNA メチル化と老化の関連を調べるに当たり、本研究ではゼブラフィッシュを実験材料に選んだ。マウスなどの哺乳類では加齢に伴いゲノム領域によりメチル化レベルが上がる場合と下がる場合があるのに対し、ゼブラフィッシュのゲノムでのエピジェネティックドリフトの変動は単純で、加齢によるメチル基の脱落のみである。そして受精後、すなわち次世代の出発時に元の高メチル化状態に戻る（リセット）。そのためゼブラフィッシュでは、ゲノムのメチル化レベルを上げることで若返りに、下げることで老化に繋がるのが期待される。

ゼブラフィッシュのゲノムのメチル化レベルを変化させるには、リセットを担う酵素の同定が必要となる。脊椎動物の受精時にシトシンにメチル基を新たに付与する酵素が *de novo* 型 DNA メチル化酵素で、これは Dnmt3 と名付けられている。ゼブラフィッシュには Dnmt3 様タンパク質をコードする *dnmt3* のホモログが 6 つ存在する (*dnmt3aa*, *ab*, *ba*, *bb.1*, *bb.2*, *bb.3*) が、どの Dnmt3 タンパク質がリセットを担っているか、またそれは一つなのか複数なのかは明らかでない。そこで、ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9 システム) を用いてゼブラフィッシュの 6 つの *de novo* 型 DNA メチル化酵素遺伝子をそれぞれ欠損させた変異体を作製し、胚性致死ではない変異体についてはそのまま成長させ、老化表現型の観察を行なった。さらに母性胚性変異体を作製し、その初期胚における DNA メチル化状態のリセットを解析し、リセットに関与する遺伝子の同定を行なった。

また、エピジェネティックドリフトが遺伝子発現の制御にどのような影響を及ぼすのかについての解析として、前途で作製した *dnmt3bb.2* 変異体について全ゲノムメチル化解析とトランスクリプトーム解析を行い、その結果の突き合わせにより Dnmt3bb.2 タンパク質が標的とする遺伝子を明らかとした。*dnmt3bb.2* 変異体におけるその標的遺伝子の発

現を、発現量や転写開始点、スプライシング、転写産物構造の完全性(integrity)などの視点から解析することで、エピジェネティックドリフトが遺伝子に何をもたらすのかの判断を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究は、相手方の同意・協力を必要とする研究、個人情報の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、法令および研究医機関の規則に従って実験計画の申請手続きを適切に行なった。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心がけた。動物実験に関しては、必要最低限の個体を用い、出来る限り苦痛を軽減するよう配慮した。

C. 研究結果

リセットは受精直後に生じるのであるから、リセットを担う Dnmt3 タンパク質は単独であるにせよ複数であるにせよ、あらかじめ卵母細胞に蓄えられていると想定された。これまでの当研究室及び他の研究室での実験から、6つの *de novo*型 DNA メチル化酵素遺伝子(*dnmt3*)ホモログすべてにおいて、それぞれの転写産物が卵母細胞に存在することがわかっている。したがって6種類の Dnmt3 タンパク質すべてが卵母細胞に存在すると予想され、いずれもリセット担当酵素の候補になり得ると考えられた。そこで各 *dnmt3* 遺伝子の変異をホモに持つ個体を作製した(胚性変異体)。この胚性変異体のメスの卵母細胞には各 Dnmt3 タンパク質が存在しないことになる。そして同様に、変異をホモにもつオスと掛け合わせれば、そのペアから産まれる個体は受精時から一生を通じて完全にその遺伝子産物フリーの個体となる(母性胚性変異体)。なお当然ながら、仮にいずれかの Dnmt3 タンパク質が生存に必須であれば、その胚性変異体は得られず、したがって母性胚性変異体胚も得られないことになる。

リセットは Dnmt3 タンパク質の母性胚性変異体で検証する必要があるため、まず各遺伝子の欠損系統の樹立を試みた。その結果、*dnmt3bb.1*(旧 *dnmt4*)、*dnmt3bb.2*(旧 *dnmt3*)、*dnmt3bb.3*(旧 *dnmt5*)、*dnmt3ba*(旧 *dnmt7*)の4つについては CRISPR/Cas9 システムにより欠損変異を導入できた。また、*dnmt3aa*(旧 *dnmt8*)、*dnmt3ab*(旧 *dnmt6*)の2つについては共同研究者から欠損変異体の譲渡を受け、最終的に6つ全ての *dnmt3* ホモログの変異体を得ることができ、いずれについても胚性変異体を得ることができた。そしてその6つの胚性変異体から産まれた母性胚性変異体を検証したところ、明確な発生異常を示さず、またリセットは正常で成体にまで成長することが分かった。このことから、*dnmt3* ホモログ間にはリセットにおいて機能相補性が存在し、複数の *dnmt3* ホモログが

関与して行われている蓋然性が高まった。そこで、*dnmt3* ホモログを多重に欠損変異させた母性胚性多重変異体の作製を進めた。

二重変異体として、*dnmt3bb.2& dnmt3bb.3*、*dnmt3bb.2& dnmt3aa*、*dnmt3ab& dnmt3ba*、*dnmt3ba& dnmt3aa* の4つの胚性変異体を作製し、その母性胚性変異体での発生とリセットの解析を行なったところ、明確な異常は示されなかった。さらに三重変異体として、*dnmt3bb.2& dnmt3bb.3& dnmt3ba*、*dnmt3bb.2& dnmt3ab& dnmt3aa*、*dnmt3bb.2& dnmt3bb.1& dnmt3bb.3* の3つの胚性変異体を作製し、その母性胚性変異体での発生とリセットの解析を行なったが、こちらも明確な異常は示されなかった。

上記の結果を踏まえ、現在 *dnmt3b* にカテゴリズされる4つの遺伝子全てを欠損変異させた *dnmt3bb.2& dnmt3bb.1& dnmt3bb.3& dnmt3ba* の胚性変異体を作製中である。

本研究ではまた、最も初期に作製した *dnmt3bb.2* 変異体を用いて、遺伝子のメチル化が果たす機能についても解析を進め、*dnmt3bb.2* 母性胚性変異体胚の全ゲノムメチル化シーケンスおよび発現マイクロアレイ解析のデータを突き合わせることで、変異体においてDNAメチル化と発現量の双方に異常を示す遺伝子としてアンジオポイエチン様遺伝子 *angiopoietin like 1b* (以下、*angpt1b*) を見出した。*dnmt3bb.2* 母性胚性変異体胚では *angpt1b* のジーンボディのメチル化が失われており、発現量が著しく増加していた。この遺伝子のホモログである *angpt1a* 及び *angpt2b* については、すでに他の研究室において、ゼブラフィッシュ胚の脈管形成に必要であることが示されていた。一方、*dnmt3bb.2* 母性胚性変異体胚では、以前より一過的な血管形成異常と血流速度低下が観察されていたことから、この表現型が *angpt1b* の機能異常によりもたらされることが推測された。

次に *dnmt3bb.2* 母性胚性変異体胚における *angpt1b* の転写開始点を検証した。するとプロモーターからの正常な *angpt1b* の転写が一切見られず、その転写は *angpt1b* 遺伝子内部低メチル化領域 (主に第二エクソン) の様々な位置からスタートしていることを見出した。それらの転写産物からは *angpt1b* タンパク質への翻訳は期待されない。したがって、発現マイクロアレイ解析において *dnmt3bb.2* 母性胚性変異体胚では *angpt1b* の発現量は一見亢進しているとみられたものの、実際には *angpt1b* タンパク質は失われていると考えられた。これらの結果から、ジーンボディのメチル化が *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。

以上のように、ゼブラフィッシュ初期胚における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製、並びにメチル化異常が遺伝子発現に及ぼす影響の解析を当初の計画通り順調に進めることができた。

D. 考察と結論

ゼブラフィッシュに存在する Dnmt3 様タンパク質をコードする *dnmt3* の 6 つのホモログ (*dnmt3aa, ab, ba, bb.1, bb.2, bb.3*) 単体を欠損変異させた個体の初期胚におけるメチル化リセットの異常は認められず、*dnmt3* ホモログ間でのリセットに関する機能相補性の存在が示唆された。さらに二重変異体、三重変異体での母性胚性変異体における初期胚のメチル化リセットの解析でも異常は認められず、引き続き哺乳類の *dnmt3b* にカテゴライズされる 4 つの遺伝子 (*dnmt3bb.2, dnmt3bb.1, dnmt3bb.3, dnmt3ba*) 全てを欠損させた胚性変異体の作製を進めている。

また最近、DNA メチル化の維持をすることが知られている *dnmt1* の *de novo* 型メチル化酵素としての活性が学会で報告された。そこで今後、当研究室で維持している *dnmt1* の機能低下型変異体の胚性変異体から母性胚性変異体を作製し、リセットの解析を進める予定である。

de novo 型 DNA メチル化酵素の同定は、エピジェネティックドリフトと老化との因果関係を明らかにする上で必要不可欠であり、その因果関係が立証できればメチル化酵素の機能を調整することにより老化を制御することが可能となることが期待される。

dnmt3bb.2 母性胚性変異体胚の全ゲノムメチル化シーケンスおよび発現マイクロアレイ解析のデータを突き合わせることにより、*dnmt3bb.2* のターゲット遺伝子として *angpt11b* が見出された。*dnmt3bb.2* 母性胚性変異体胚では *angpt11b* のジーンボディのメチル化が失われており発現量が著しく増加していたが、その転写開始点は正常な位置からではなく、正常な翻訳産物の合成が期待出来るものでは無かった。このことにより、ジーンボディのメチル化が *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が明らかとなった。この結果は、マイクロアレイなどの発現解析において得られる結果が必ずしも正常な発現、さらにはそれから推測される機能を有さないことを示唆しており、今後の発現解析での結果への慎重な解釈が必要であることが示された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2019年度

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 USA. pii: 201915223(2019)

2020年度

1) 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

2019年度

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 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