

本城 咲季子, 西田 栄介

(京都大学大学院生命科学研究科シグナル伝達学分野)

The mechanisms underlying dietary restriction-induced longevity

Sakiko Honjoh and Eisuke Nishida (Department of Cell and Developmental Biology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawaoiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan)

## エピジェネティックな遺伝子発現制御のための DNAメチル化酵素の創製

### 1. はじめに

セントラルドグマの提唱以来、遺伝子情報と生体機能の制御にまつわる生体分子およびその修飾が注目されてきた。エピジェネティクス分野における研究では、翻訳後のタンパク質修飾(リン酸化, メチル化, アセチル化など), RNAによる転写調節などと併せて遺伝子のメチル化が重要な研究対象である。哺乳類細胞ではシトシンの5'位がメチル化を受け、ヒト細胞内では実に7割のCpG配列がメチル化を受けていることが明らかにされている。遺伝子でのメチル化の役割は遺伝子情報の読み出しの制御が主なものである。メチル化を受けているCpG配列にはメチル化シトシン結合タンパク質が結合し、さらにタンパク質複合体が形成され、クロマチンの脱アセチル化が促進される。脱アセチル化を受けた部位ではクロマチン構造が密な状態となり遺伝子の転写がオフの状態になる。DNAメチル化はゲノムDNAの機能制御において重要な役割を果たしており、胚発生時に行われるゲノムインプリンティングは細胞の運命を司るコードとしてその解明が急速に進んでいる。がん細胞においてメチル化パターンの異常がみられることから、DNAメチル化は細胞のがん化に密接に関わるとされている。また、最近ではメチル化パターンと細胞のリプログラミングの関連が注目されている。このようにDNAメチル化はDNA機能の一端を担っていることから、人為的にメチル化を制御することの重要性が認識されている。本稿ではエピジェネティクス分野においてDNAメチル化に関連した最近の研究の動向、特に人工的なメチル化制御に関して解説する。

### 2. 研究の背景

メチル化されたシトシン塩基はメチル化シトシン結合タンパク質(MeCP2)によって認識され、MeCP2が他のタンパク質との会合体を形成し、ヒストンの脱アセチル化を行う。これによりヒストンの構造変化が誘起された部分のゲノム遺伝子では転写反応が抑制を受ける。シトシン塩基のメチル化は細胞分裂後も保存されるので、永久的にこの転写抑制が保存される。遺伝子の転写抑制はRNAiや転写抑制ドメインを用いる方法などで一時的な制御は可能であるが、細胞分裂後も保存される永久的な抑制を可能にするのがシトシンのメチル化であると考えられる<sup>1)</sup>。シトシンのメチル化はがん細胞中の特定の配列で高頻度に観察される(図1A, B)<sup>2)</sup>。このため、メチル化反応を人工的に制御することは有効な疾病治療の選択肢になると考えられている。このような遺伝子に対する人工的な制御を行うためには任意の標的とするDNA配列に結合するタンパク質が必要である。この役割に最適なタンパク質としてZnフィンガータンパク質に対する注目が高まっている。

Znフィンガータンパク質はその発見から四半世紀を経て、遺伝子を標的とした医療への応用が現実味を帯びてきている。Znフィンガードメインは約30アミノ酸で構成されββα構造のαヘリックス中のアミノ酸側鎖がDNAの3塩基を認識する。このモジュール構造がタンデムに連結されることから非対称かつ長鎖のDNA配列の認識が可能になる<sup>3)</sup>。これまでにファージディスプレイ法や酵母ツーハイブリッド法などを用いて大規模なライブラリー中から各コドン配列に対応するドメインが選択され、それらを組み合わせることで標的とする遺伝子配列に対して特異的に結合するDNA結合ドメインを構築することが可能となっている<sup>4)</sup>。こうした任意の標的DNA配列に結合するように“プログラム”できるという特徴を持つDNA結合ドメインはZnフィンガーのみであり、DNAを修飾する酵素に融合することで酵素の働きを制御することができるということが示されている。応用例としてDNAに働く酵素ドメインとの融合タンパク質がこれまでに数種類報告されている。DNA切断酵素、DNA組換え酵素、そしてDNAメチル化酵素がそれらの例であり、メチル化酵素については1997年にSssIとの融合体を用いたDNAメチル化に関する報告がなされた<sup>5)</sup>。他の2種類の酵素との大きな違いとしてDNAメチル化酵素はDNA結合機能と酵素活性機能がリンクしているという点がある。すなわち、同じ構造中に二つの機能に関与するアミノ酸残基が含まれている。

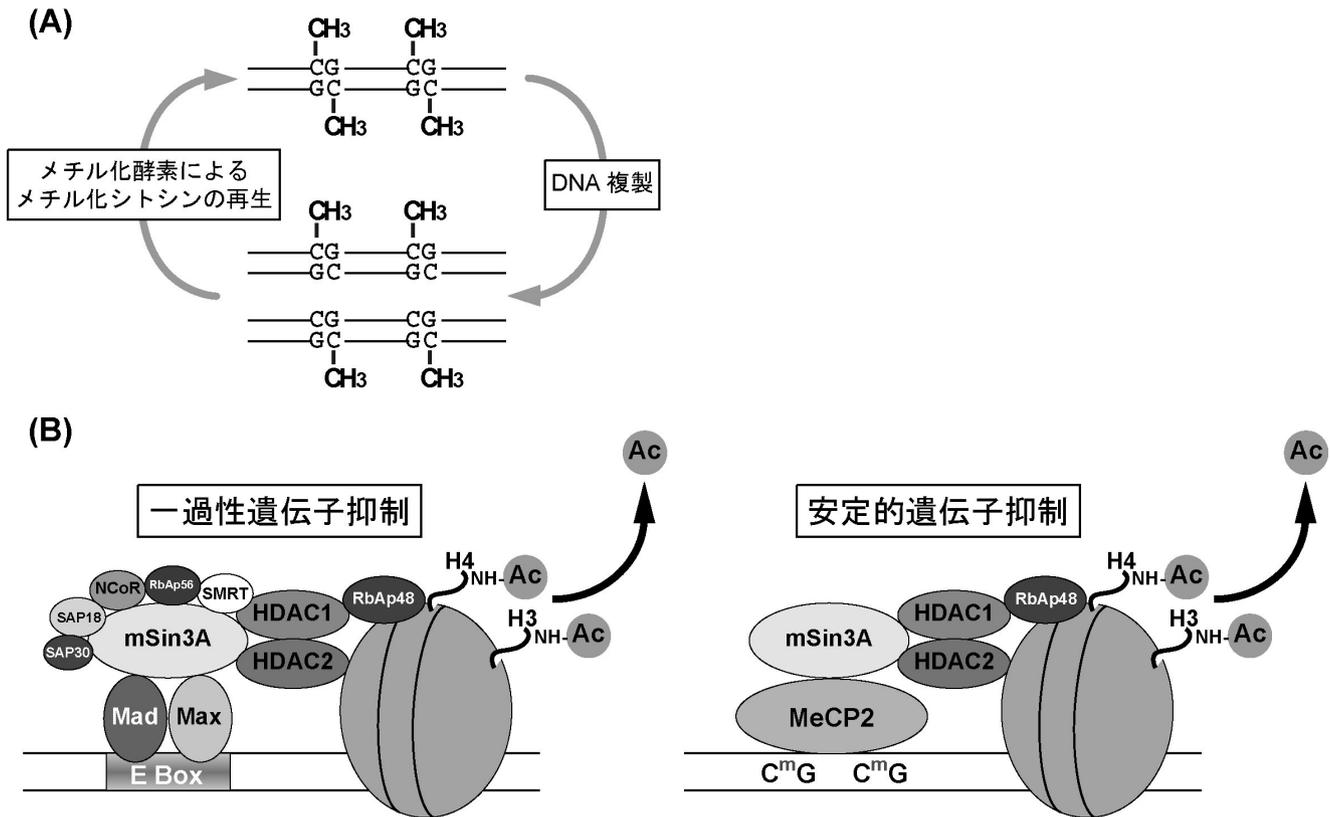


図1 (A)メチル化シトシンの保持機構について。(B)CpGメチル化による転写抑制機構と転写抑制因子群の働きの比較。一過性の抑制因子群は生理的条件の変化に応じて形成される(左)。一例としてE Boxなどの抑制エレメント配列をMad-Maxヘテロ二量体やホルモンレセプターが認識し、それらがコリプレッサーmSin3Aと相互作用する。mSin3Aは8種類のタンパク質と相互作用する。これらに含まれるSMRTはHDAC1およびHDAC2やHDAC1とヒストンH4との間を架橋するRbAp48と相互作用する。デアセチラーゼはヒストンH3, H4上の脱アセチル基を促進する。メチル化の関与する安定的な遺伝子抑制ではCpGメチル化に対してMeCP2が結合することで開始される。MeCP2はmSin3Aと相互作用する。以下の機構は一過性のものと同様であると考えられているが明らかにされていない部分もある。

従って、全長のメチル化酵素とZnフィンガータンパク質を融合したものではメチル化酵素のDNA認識能に由来する高いバックグラウンド反応が見られるという克服すべき課題があった<sup>5-8)</sup>。

### 3. タンパク質ドメイン分割法のDNAメチル化酵素への応用

近年になって、タンパク質ドメインを分割型にしてその機能を抑制し、タンパク質間もしくはタンパク質-核酸などの相互作用によって各分割ドメインが近傍に存在する場合に再会合が起こり、タンパク質ドメインの機能が回復する方法(protein-fragment complementation assays)がユビキチンについて最初に報告された<sup>9)</sup>。この方法を酵素ドメインや蛍光タンパク質に適用することで細胞内シグナルの可視化などに有効な手段になると期待されている<sup>10,11)</sup>。原核

細胞由来のDNAメチル化酵素である*HhaI* methyltransferase (*M.HhaI*)は327アミノ酸で構成されるが、N末端側ドメイン(1-240)とC末端ドメイン(210-327)に分割することで自己会合型ドメインにできることが報告されている<sup>12)</sup>。*M.HhaI*の認識DNA配列はGCGCであり、CpG配列のシトシン塩基をメチル化する。4塩基という短い認識配列のため、ゲノムDNAに対しては無数にその標的配列が存在する。著者らはDNA認識特異性を向上させることで、ゲノムDNA中においても1箇所の特定位のみをメチル化する酵素を構築できるのではないかと考えた。そこで、Znフィンガードメインを利用してDNA結合機能に高い配列選択性を付与してDNA配列に応じた酵素ドメインの再会合を可能にすることで、ゲノムDNA中の特定部位でメチル化反応を行う人工酵素の開発を試みた(図2A)。

#### 4. 分割型 DNA メチル化酵素の機能

分割型メチル化酵素機能の解析のためにアラビノース制御プロモーター下流の2箇所に Shine-Dalgarno 配列を配置したプラスミドベクターを作製し、同時に発現が行えるシステムを構築した。分割ドメインに9塩基を認識する Zn フィンガードドメインを7アミノ酸からなるリンカー配列を介して融合した。コントロールとしてN末端ドメインのみ、Zn フィンガードドメインと *M.HhaI* 酵素全長の融合体、*M.HhaI* を用意した(図2B)。ウェスタンブロットの結果、大腸菌内での発現は分割型酵素の両ドメインにおいて十分な量が得られていることが明らかになった。メチル化反応の解析には *HhaI* 制限酵素 (*R.HhaI*) による切断を用いた。*R.HhaI* は *M.HhaI* と同じ DNA 配列 (GCGC) を認識し、配列中の CpG でのメチル化に感受性を持つため、シトシン塩基がメチル化されている場合は切断が阻害される。タンパク質発現ベクターに Zn フィンガードドメインの標的配列を含む GCGC 配列を組み込み、このサイトでのみメチル化が行われている場合にプラスミドの *R.HhaI* 処理によって1467塩基対のフラグメントが生成されるシステムとした(図2C)。この発現ベクターには他に18箇所の GCGC 配列が含まれるので、メチル化のバックグラウンド反応なども容易に検出できる。分割型メチル化酵素の反応では *R.HhaI* による切断の阻害を示す1467bpのバンドが現われた。分割ドメインの会合によってメチル化が行われていることを確認するためにN末端ドメインのみを用いたところ、*R.HhaI* での切断の阻害は観察されず、GCGC 標的配列でのメチル化には2ドメインの会合が必要であることが示された。コントロールの *M.HhaI* ドメインと Zn フィンガードドメインの融合体では、プラスミド上の全ての GCGC サイトでの *R.HhaI* による切断の阻害が確認された。この結果は、これまでの酵素ドメイン全長と Zn フィンガードモチーフの融合体に関する研究で報告されている通り、*M.HhaI* 自体の DNA 結合親和性の影響が大きく、DNA 配列に対して非特異的なメチル化が行われていることを示すもので、我々の新たに開発した分割型メチル化酵素の DNA 配列に対する特異性の高さが示された(図2C)。また、*M.HhaI* ドメインのみの発現においても全長型酵素(B-4)と同様の結果が得られた。

バイサルファイト反応はシトシン塩基をウラシル塩基に置換する反応であり、メチル化されたシトシンは反応を受けない。バイサルファイト反応後の DNA に PCR を行うと、シーケンス解析の際に修飾を受けていないシトシン

はチミンとして、メチル化を受けているシトシンはそのまま検出される。この手法を用いて、分割型メチル化酵素の DNA 配列特異的なメチル化反応を検出した。その結果、N末端ドメインのみではメチル化は観察されないが、全長融合型および分割型メチル化酵素の場合では標的配列でのシトシンメチル化が観察された。さらに標的配列以外の GCGC 配列では全長融合型のみでメチル化が観察され、分割型メチル化酵素の標的配列に対する特異性の高さが確認された<sup>13)</sup> (図2D)。

#### 5. その他の標的配列特異的メチル化酵素

ドメイン分割法を用いる以外にも DNA メチル化酵素の配列特異性を向上させる試みが行われている。その例として全長型のメチル化酵素の配列特異性を向上させる方法としてバックグラウンド反応を抑制する方法がある。これはすなわち、アミノ酸変異を導入してメチル化酵素活性を抑えることで Zn フィンガードによる DNA 認識を優位に働かせることが可能になる方法である。このメチル化酵素を哺乳類細胞内において発現させ、標的配列におけるメチル化反応とヒストンメチル化の変化量を定量した結果、標的配列周辺におけるメチル化は上昇し、ヒストンメチル化に関しても H3K4Me3 の減少と H3K9Me2 の増加が確認された。また、このような Zn フィンガード融合型メチル化酵素を用いて哺乳類細胞内での転写抑制が行われることも示されている。

#### 6. 今後の展望

我々が開発した分割型メチル化酵素はこれまでの全酵素ドメインとの融合体に比べて、標的配列に対する特異性という点において優れた結果を示すことができた(図3)。DNA 配列に対する Zn フィンガードモチーフによる特異的な結合を用いた分割型酵素の再会合は GFP、 $\beta$ -lactamase を用いて行われた例がある<sup>14)</sup>。これらは、ドメイン間の再会合がゲノム DNA 上において可能である場合、一塩基多型などのレポーターとして非常に有望である。しかし、いずれの例においても *in vitro* での機能を示すだけにとどまっていた。今回我々が行った *in vivo* での分割型酵素の再会合は最初の例であり、今後の哺乳類細胞内での応用に期待を抱いている。また、DNA 配列に対する修飾反応であるという点においても最初の例であり、ナノテクノロジー分野における応用も可能であると考えられる。DNA メチル化酵素は補因子となる *S*-アデノシル-L-メチオニンの誘導体を取り込んで、酵素反応を行うことで特定の

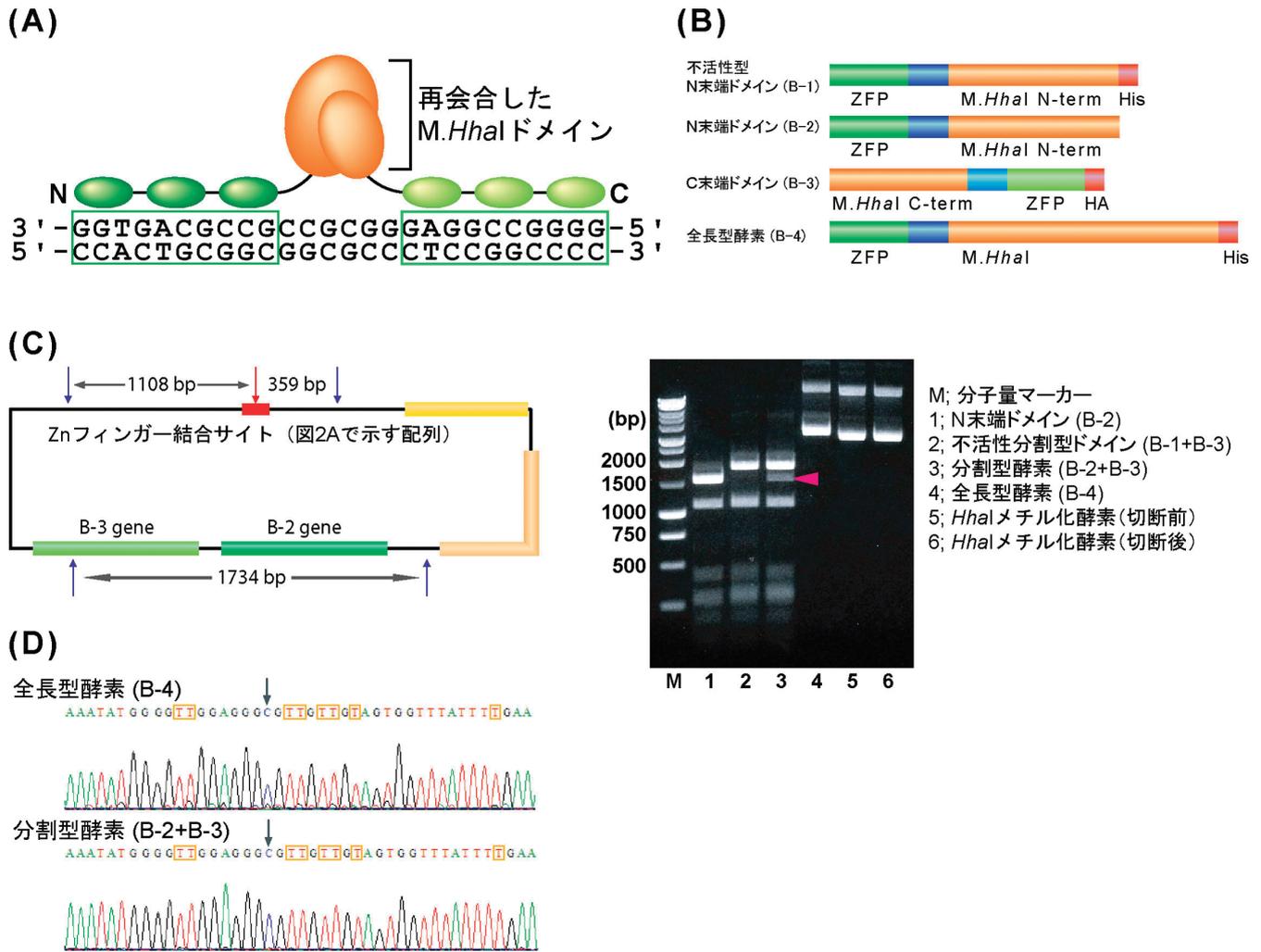


図2 (A) 構築した分割型メチル化酵素のモデル図。標的 DNA 配列に対して Znフィンガーが結合し、その間の GCGC 配列がメチル化を受ける。(B) 実験に用いた分割型酵素及び融合体の概要。分割型酵素には B-1 もしくは B-2 と B-3 の組み合わせを用いた。それぞれ ZFP; Znフィンガードメイン, *M.HhaI* N-term; *HhaI* メチル化酵素の N末端側ドメイン (1-240), *M.HhaI* C-term; *HhaI* メチル化酵素の C末端側ドメイン (210-327), His; ヒスチジンタグ, HA; HA タグを表す。青色はリンカー配列部分を表す。不活性型 N末端ドメインは C末端にヒスチジンタグが付加しているため再会合を阻害すると考えられた。(C) *HhaI* 制限酵素切断によるメチル化反応検出に用いたプラスミド (左) とその検出結果 (右)。青矢印で示したのは主な *HhaI* 切断部位であり、赤矢印は Znフィンガー標的サイト中の *HhaI* 切断部位を示す。配列特異的なメチル化が起きている場合は赤矢印部分は切断を受けず、レーン3で示すようなフラグメントが検出された。また、他の *HhaI* 切断部位も非特異的にメチル化を受けている場合はプラスミドが切断されず、レーン4またはレーン6のような結果となった。(D) バイサルファイトシーケンス解析による GCGC 標的配列でのメチル化反応解析。

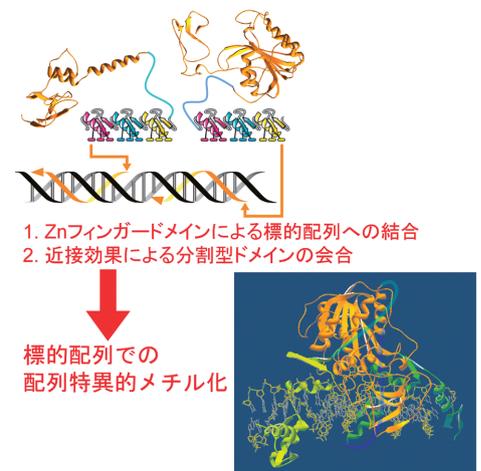


図3 分割型メチル化酵素による DNA 配列特異的なメチル化反応の概要と標的 DNA 配列上での再会合の予測図<sup>12)</sup>

DNA 配列に対するタグ付けが可能である<sup>15)</sup>。従って、分割型メチル化酵素の基質結合ポケットの最適化によって、配列特異的な DNA 標識が行えると考えられる。分割型メチル化酵素の機能解析については現在、*in vitro* での解析および哺乳類細胞内における機能という両面からのアプローチを展開している。

Zn フィンガータンパク質の DNA 配列に対する特異性を利用した標的遺伝子マニピュレーションでは DNA 切断酵素が医療への実用化という面において一歩リードしている。今後は、他の酵素（組換え酵素、メチル化酵素など）もそれぞれの特長を生かして、医療分野でのニーズに即した実用性のある研究展開が行われることが期待される。

- 1) Bird, A. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 6–21.
- 2) Esteller, M. (2007) *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 286–298.
- 3) Hirata, T., Nomura, W., Imanishi, M., & Sugiura, Y. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 2197–2201.
- 4) Segal, D.J., Beerli, R.R., Blancafort, P., Dreier, B., Effertz, K., Huber, A., Kokschi, B., Lund, C.V., Magnenat, L., Valente, D., & Barbas, C.F., III (2003) *Biochemistry*, **42**, 2137–2148.
- 5) Xu, G.L. & Bestor, T.H. (1997) *Nat. Genetics*, **17**, 376–378.
- 6) Carvin, C.D., Parr, R.D., & Kladdde, M.P. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6493–6501.
- 7) Li, F., Papworth, M., Minczuk, M., Rohde, C., Zhang, Y., Ragozin, S., & Jeltsch, A. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 100–112.
- 8) Smith, A.E., Hurd, P.J., Bannister, A.J., Kouzarides, T., & Ford, K.G. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 9878–9885.
- 9) Johnsson, N. & Varshavsky, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 10340–10344.
- 10) Magliery, T.J., Wilson, C.G., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., Hamilton, A.D., & Regan, L. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 146–157.
- 11) Galameau, A., Primeau, M., Trudeau, L.E., & Michnick, S.W. (2002) *Nat. Biotechnol.*, **20**, 619–622.
- 12) Choe, W., Chandrasegaran, S., & Ostermeier, M. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 1233–1240.
- 13) Nomura, W. & Barbas, C.F., III (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8676–8677.
- 14) Ghosh, I., Stains, C.I., Ooi, A.T., & Segal, D.J. (2006) *Mol. Biosyst.*, **2**, 551–560.
- 15) Lukinavicius, G., Lapine, V., Stasevskij, Z., Dalhoff, C., Weinhold, E., & Klimasauskas, S. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 2758–2759.

野村 渉<sup>1</sup>, 増田 朱美<sup>1,2</sup>, 玉村 啓和<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>東京医科歯科大学学生体材料工学研究所,

<sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所)

Development of site-specific DNA methylase for epigenetic regulation of gene expression

Wataru Nomura<sup>1</sup>, Akemi Masuda<sup>1,2</sup> and Hirokazu Tamamura<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan)

## 植物における小分子 RNA の動態制御

### 1. 植物における小分子 RNA の発見

線虫において *lin-4*, *let-7* といった小分子 RNA が発見されると、これがきっかけとなりショウジョウバエからヒト、さらにはシロイヌナズナ、イネなどの植物にも 21 塩基長ほどの小分子 RNA が多く発見されるようになった。

そのなかで microRNA (miRNA) は 19–24 塩基長の非翻訳 RNA として動物、植物で広く知られるようになった。miRNA は相補的な配列をもった標的 mRNA と結合し、その mRNA の分解あるいは翻訳抑制を導き<sup>1)</sup>、遺伝子の発現の on/off を微調整する。miRNA/標的 mRNA 制御系は多くの遺伝子に関係することが明らかとなるにつれ、今では真核生物の遺伝子発現において広く一般的に用いられているもので、制御の緻密さを与えているものとして考えられるようになった<sup>2)</sup>。遺伝子の数が問題なのではなく、いかにしてそれらを使うか、抑えるかが、生物が進化するうえで重要だったのであろう。

植物の形態形成について、最近分子レベルでの研究が進展し理解が進んでいる。そしてオーキシンなどの植物ホルモンの作用、組織間の信号伝達が関与する形態形成や環境応答における遺伝子発現制御にも miRNA が関与していることが明らかとなっている<sup>3)</sup>。たとえば植物の茎の先端には茎頂分裂組織があって、そこには分裂を続ける主な細胞が存在する。そこから、分裂を続ける細胞群と、未分化状態からはずれて組織の分化へと向かう細胞群とが生まれていく。上下、向背性・向腹性（葉の表裏など）などの軸方向に沿って運命の異なる複数の組織、細胞群が生み出さ