

## トピックス

# DNA配列に基づく活性制御が可能なDNAメチル化酵素の開発

## In Vivo Site-Specific Methylation by Zinc Finger Tethered Split Methylase

野村 渉<sup>1)</sup>, 玉村 啓和<sup>1)</sup>, Carlos F. BARBAS, III<sup>2)</sup>

Wataru NOMURA<sup>1)</sup>, Hirokazu TAMAMURA<sup>1)</sup>, Carlos F. BARBAS, III<sup>2)</sup>

### Abstract

Covalent modification of DNA, such as cytosine methylation, can induce heritable gene silencing. If epigenetic modifications can be specifically targeted, new approaches to transcriptional therapy should result. To address this challenge we sought to design methyltransferases that would act only at a desired site by adapting the sequence-enabled assembly strategy. We hypothesized that a functional and site-specific enzyme could be self-assembled on a particular DNA sequence using zinc finger proteins (ZFPs) appropriately fused to a recently described split M.HhaI enzyme. If correctly designed, such a heterodimeric protein would be active only at the site of assembly and not elsewhere. To explore this hypothesis, each domain of split M.HhaI (N- or C-terminal domains) was fused to previously designed 3-finger ZFPs, HS1 and HS2. Our split DNA methylase performed site-specific CpG methylation in living cells without any background methylation when appropriately assembled at the target site. This is the first successful application of the sequence-enable enzyme reassembly approach in vivo.

### はじめに

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、胚発生時に行な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。癌細胞中におけるメチル化DNAの異常などは細胞の癌化に密接に関わるとされている。このようにDNAメチル化はDNA機能の一端を担っており、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。亜鉛フィンガーモチーフはDNA配列に高い選択性をもって結合することで知られており、他の機能性ドメインとの融合体とすることで標的とするDNA配列上で機能を発揮させるツールとして期待される。本研究ではDNA配列に応じた酵素ドメインの再会合によってゲノムDNA中での特定部位でのメチル化反応を行なう人工酵素の開発を行なった。

### 1. 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なう。これによってヒストンの構造変化が誘起されているゲノム配列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間の世代を跨いで保存されるので、永久的にこの転写反応の抑制は保存される。遺伝子の転写反応の抑制は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この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癌細胞中の特定の配列で高頻度に観察されることが報告されている (図1A及び1B)。<sup>2)</sup>

酵素ドメインの分割、再会合は分割したドメインに付加した二量化ドメイン間の会合条件のみにおいて酵素機能が発揮され、細胞内シグナルの可視化などに非常に有効な手段として期待される。<sup>3), 4)</sup> DNAシトシンメチル化酵素であるHhaI Methyltransferase (M.HhaI) は320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に分割することでも細胞内で自己会合しメチル化反応を行なう。<sup>5)</sup> 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。そのDNA認識特異性を更に向上させることで、ゲノムDNA中においても1ヶ所の

1) 生体材料工学研究所 分子認識分野  
Department of Molecular Recognition,  
Institute of Biomaterials and Bioengineering

2) The Departments of Chemistry and Molecular Biology  
The Scripps Research Institute

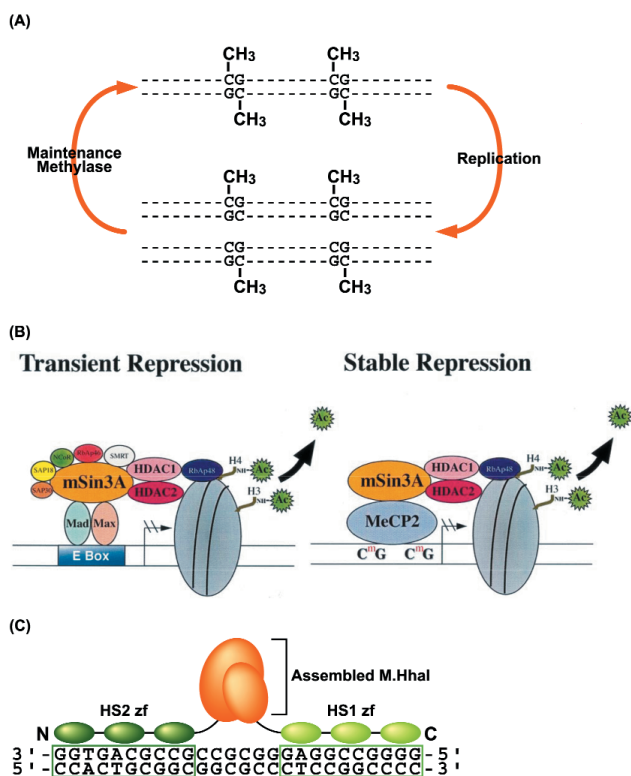


図1 (A) 世代間を跨ぐメチル化シトシンの保持機構 (B) CpGメチル化による転写抑制機構と転写抑制因子群の働きの比較 (C) 予想されるDNA上での再会合と用いた標的DNA配列

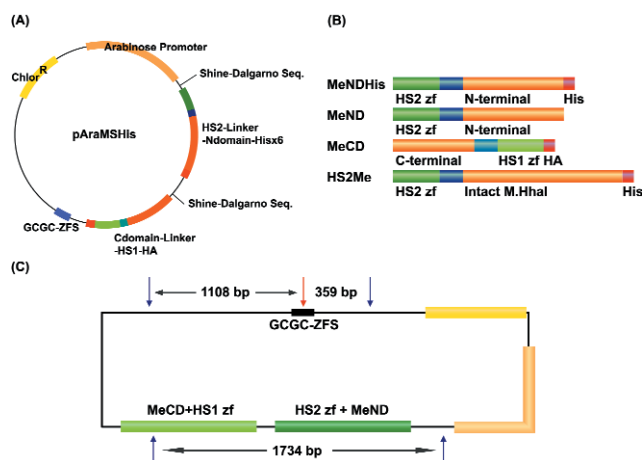


図2 (A) 分割型メチル化酵素をコードするpAraベクターの詳細 (B) 実験に用いた分割型酵素及び融合体の概要 (C) pAraベクターのHhaI制限酵素切断パターン

特定部位のみをメチル化することが可能であると考えられる。これまでの試みとして、全酵素ドメインに対してDNA結合タンパク質である亜鉛フィンガードメインを融合させることでDNA配列に対する特異性を向上させる例が挙げられる。<sup>(6-9)</sup> この融合タンパク質ではメチル化酵素由来のDNA認識機能がそのまま残されているため、非特異的なメチル化がバックグラウンドとして観察され、解決されるべき課題として残されてきた。

そこで筆者らはシトシンメチル化酵素であるM.HhaIの分割型酵素を亜鉛フィンガードメインと融合させるこ

とでゲノム中での特定のDNA配列に対するメチル化修飾が可能である酵素の開発を行なった(図1C)。

## 2. 方法

### 2.1 分割型メチル化酵素の構築、発現

発現ベクターとしてpAraベクターを用いた(図2A)。このベクターではpBADプロモーターによってタンパク質発現が制御されており、その下流の2箇所にShine-Dalgarno配列を配置することで、2種類のタンパク質を発現させることが可能である。亜鉛フィンガードメインとしてBarbas研究室で開発され、結合配列やDNA結合親和性が明らかなHS1, HS2を用いた。<sup>10)</sup> それぞれのモチーフは3つのモジュールからなり、9塩基を認識することができる。これらHS1, HS2をそれぞれM.HhaIの210-327 (C末端ドメイン) と1-240 (N末端ドメイン) との融合体にするため、7アミノ酸からなるリンカー配列で連結した。大腸菌内でのタンパク質の発現はそれぞれの分割ドメインにHisx6 (N末端ドメイン), HA (C末端ドメイン) のタグ配列をコードすることでウェスタンブロットによる検出を可能にした (図2B)。

分割型メチル化酵素の再会合においてN末端側ドメインに付加されたHistidineタグがドメイン間の再会合を阻害する可能性が考えられたため、Histidineタグを取り除いたN末端側ドメインの組み合わせも作成した。コントロールとして、N末端ドメインのみ、HS2亜鉛フィンガードメインとM.HhaI酵素の融合体、M.HhaI酵素のみ、HS2-M.HhaI-HS1の順に融合した酵素を用意した(図2B)。

### 2.2 In vivoでのメチル化機能の解析

大腸菌内での分割型メチル化酵素の機能解析にはHhaI制限酵素による切断を用いることにした。HhaI制限酵素はM.HhaIと同じ認識配列を持ち、認識配列中のCpGでのメチル化に感受性をもち、シトシン塩基がメチル化されている場合には切断が阻害されることが知られている。タンパク質発現ベクターであるpAraに亜鉛フィンガードモチーフの認識サイトを含むGCGC配列GCGC-ZFSを組み込むことでこのサイトでのみメチル化が行なわれている場合には1467塩基のバンドが生成されるシステムを作成した (図2C)。このpAraベクターはGCGC-ZFSサイトの他に18ヶ所のGCGCサイトを含むので、このベクターを用いることによりメチル化のバックグラウンド反応なども容易に検出することか可能となった。

### 2.3 Bisulfiteシーケンシング法によるメチル化シトシンの検出

Bisulfite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ことが知られている。Bisulfite反応後のDNAにPCRをかけることによって、シーケンシング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シトシンのまま検出することができる。

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。pAraベクターにBstBI断片として挿入したGCGC-ZFS配列を検出するプライマー対を設計した。また、非特異的なメチル化反応の検出のため、GCGC-ZFS配列以外の部分でGCGC配列が比較的隣接している配列部分を検出するプライマーも合わせて設計した。

### 3. 結果

#### 3. 1 pAraベクターでの分割型メチル化酵素の発現

分割型メチル化酵素MeNDHis+MeCDの組み合わせをコードしたpAraベクターを大腸菌株に形質転換し、生じたコロニーを一晩培養して菌体を得た。その菌体の抽出液をウェスタンブロットに用いた。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(図3A)。

#### 3. 2 HhaI制限酵素切断によるDNA配列特異的なメチル化の検出

大腸菌内で分割型メチル化酵素発現後、プラスミドDNAを回収し、HhaI制限酵素切断反応を行なった。MeNDHisとMeCDの組み合わせでは、メチル化反応を示すバンドが検出されなかったことから、N末端ドメインのC末側に存在するHisx6タグがドメイン間の適切な会合を阻害している可能性が考えられた。そこで、Histidineタグを除いたMeNDとMeCDの組み合わせでの反応を行なったところ、HhaI制限酵素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なわれていることを確認するためにMeNDHisのみを発現するベクターを用いたところ、HhaI制限酵素での切断の阻害は観察されず、GCGC-ZFSサイトでのメチル化には2ドメインの会合が必要であることが示された。M.HhaIドメインとHS2亜鉛フィンガーモチーフの融合体では、プラスミド上の全てのGCGCサイトでのHhaI制限酵素による切断の阻害が確認された。この結果は、これまでの全酵素ドメインと亜鉛フィンガー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な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。また、M.HhaIドメインのみの発現においてもHS2Meと同様の結果が得られた(図3B)。M.HhaIを分割型にすることによって標的配列への特異性が高くなっていることを確認するために、M.HhaIのN末端側にHS2、C末端側にHS1を融合させたHS2MHhaIHS1を構築し、そのメチル化をHhaI制限酵素切断によって確認した。その結果、M.HhaIが全酵素ドメインとして残っているために、プラスミド上に存在するGCGC配列のすべてでメチル化が

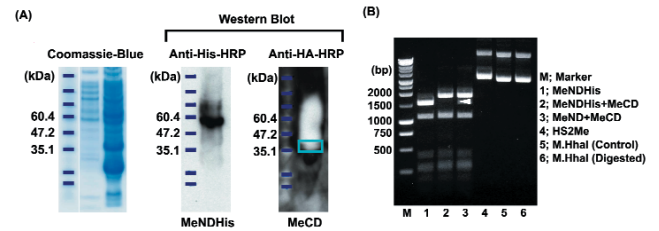


図3 (A) クーマシーブルー染色、及びウェスタンブロットによる大腸菌内での分割型メチル化酵素の発現の確認 (B) HhaI制限酵素切断によるメチル化反応の確認

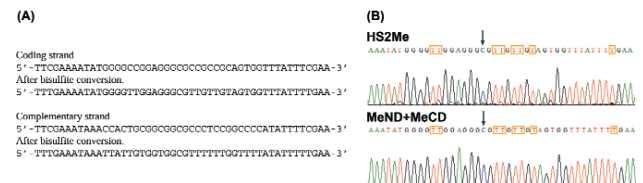


図4 (A) GCGC-ZFS配列においてメチル化が行われている場合のBisulfiteシーケンシングの結果 (B) GCGC-ZFS配列におけるBisulfiteシーケンシングの結果(HS2Me, 及びMeND+MeCD)

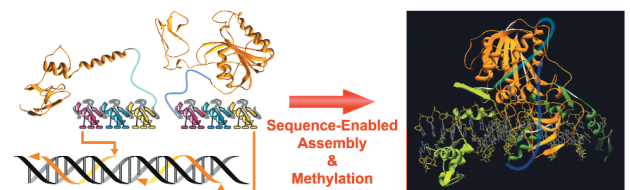


図5 分割型メチル化酵素によるDNA配列特異的なメチル化反応の概要と標的DNA配列上でのM.HhaIの再会合の予測図<sup>(4)</sup>

行われていることが示された。

#### 3. 3 Bisulfiteシーケンシングによるシトシンメチル化の確認

標的配列でのメチル化をより詳細に解析するためにBisulfiteシーケンシングを行なった。Bisulfiteシーケンシングには、メチル化を行なわないコントロールとしてMeNDHisのみのサンプル、また非特異的なメチル化のコントロールとしてHS2Meのサンプル、そして特異的なメチル化のサンプルとしてMeNDとMeCDの組み合わせを用いた。GCGC-ZFS配列におけるシーケンシングの結果、MeNDHisではメチル化は観察されないが、HS2MeおよびMeND+MeCDの場合ではGCGC-ZFS配列におけるシトシンのメチル化が見られた(図4)。

#### まとめ

これまでに報告されているDNA配列に対して特異的に働くメチル化酵素の例は全てがメチル化酵素の全アミノ酸配列と亜鉛フィンガーモチーフの融合体によって作られたものであった。シトシンメチル化酵素においては、メチル化反応を行なうアミノ酸配列とDNA結合に働くアミノ酸配列が非常に近接して存在し、DNA結合とメチル化反応が同時に行なわれることが示唆されている。その

ため、メチル化酵素そのものを用いた融合体では亜鉛フィンガーモチーフのDNA結合親和性がメチル化酵素由来のDNA結合と共存するため、亜鉛フィンガーモチーフの認識配列付近でのメチル化が顕著に見られる例はあるものの、同時に非特異的なメチル化反応も非常に高い確立で観察されていた。本研究によって開発され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、配列に対する特異性という点において非常に優れた結果を示すことができた。

DNA配列に対する亜鉛フィンガー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などを用いて行なわれた例が報告されている。<sup>11), 12)</sup> これらの例は、再会合がゲノムDNA中において可能である場合に、DNA配列の変異などのレポーターとして非常に有望視されている。しかし、いずれの例においてもin vitroでの解析結果のみが報告されていた。今回我々が行なったin vivoでの分割型酵素の再会合は初の例であり、今後の哺乳類細胞内での応用に大きな期待を抱くことができる。また、DNA配列に対する修飾における報告においても初の例であり、今後のナノテクノロジー分野における応用にも有用であると考えられる。DNAメチル化酵素は補因子となるS-Adenosyl-L-Methionineの誘導体を取り込んで、酵素反応を行なうことで特定のDNA配列に対するタグ付けが可能であることが報告されている。<sup>13)</sup> 従って、分割型メチル化酵素を用いることによって、さらに高いDNA配列特異性によってDNA標識を行なうことができるものであると期待できる。

## 謝辞

本稿は著者が留学時に米国スクリプス研究所分子生物学部門のCarlos F. Barbas, IIIの教授グループで行なった研究を紹介したものです。留学に際しまして、フェローシップ奨学助成金の援助を頂いた三共生命科学研究振興財団に深謝致します。

## 参考文献

- 1) Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16:6-21, 2002.
- 2) Esteller, M. Cancer epigenetics: DNA methylomes and histone modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 8:286-98, 2007.
- 3) Magliery, T. J., Wilson, C. G., Pan, W., Mishler, D., Ghosh, I., Hamilton, A. D., Regan, L. Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: Scope and mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:146-57, 2005.
- 4) Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L. E., Michnick, S. W. b-Lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein-protein interactions. *Nat. Biotechnol.*, 20:619-22, 2002.
- 5) Choe, W., Chandrasegaran, S., Ostermeier, M. Protein fragment complementation in M.HhaI DNA methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 334:1233-40, 2005.
- 6) Xu, G. L., Bestor, T. H. Cytosine methylation targetted to pre-determined sequences. *Nat. Genet.*, 17:376-8, 1997.
- 7) Carvin, C. D., Parr, R. D., Kladde, M. P. Site-selective in vivo targeting of cytosine-5 DNA methylation by zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* 31:6493-501, 2003.
- 8) Smith, A. E., Ford, K. G. Specific targeting of cytosine methylation to DNA sequences in vivo. *Nucleic Acids Res.* 35:740-54, 2007.
- 9) Li, F., Papworth, M., Minczuk, M., Rohde, C., Zhang, Y., Ragozin, S., Jeltsch, A. Chimeric DNA methyltransferases target DNA methylation to specific DNA sequences and repress expression of target genes. *Nucleic Acids Res.* 35:100-12, 2007.
- 10) Eberhardy, S. R., Goncalves, J., Coelho, S., Segal, D. J., Berkhout, B., Barbas, C. F., III. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication with artificial transcription factors targeting the highly conserved primer-binding site. *J. Virol.*, 80:2873-83, 2006.
- 11) Stains, C. I., Porter, J. R., Ooi, A. T., Segal, D. J., Ghosh, I. DNA sequence-enabled reassembly of the green fluorescent protein. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:10782-3, 2005.
- 12) Ooi, A. T., Stains, C. I., Ghosh, I., Segal, D. J. Sequence-enabled reassembly of b-lactamase (SEER-LAC): A sensitive method for the detection of double-stranded DNA. *Biochemistry*, 45:3620-5, 2006.
- 13) Lukinavicius, G., Lapine, V., Stasevskij, Z., Dalhoff, C., Weinhold, E., Klimasauskas, S. Targeted labeling of DNA by methyltransferase-directed transfer of activated groups (mTAG). *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 2758-9, 2007.
- 14) Nomura, W., Barbas, C. F., III. In vivo site-specific DNA methylation with a designed sequence-enabled DNA methylase. *J. Am. Chem. Soc.*, 129:8676-7, 2007.