

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16100

研究課題名（和文）SunTag法によるヒストン編集を利用した脂肪分化制御技術の開発

研究課題名（英文）Artificial regulation of adipocyte differentiation by histone editing using a SunTag method

研究代表者

鈴木 智大（Suzuki, Tomohiro）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：00804775

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：肥満は日本国民の20-30%を占めており、生活習慣病の罹患リスクとなることから根本的な治療方法の開発が必要である。本研究では、細胞の遺伝子情報を改変することなく、遺伝子の発現に寄与するヒストンのメチル化修飾を人工的に制御することで脂肪前駆細胞の脂肪細胞化を抑制することを目指した。SunTag法というCRISPR-Cas9と抗原抗体反応を組み合わせさせた技術により、脂肪細胞化を制御する遺伝子領域にヒストン修飾酵素を動員することで、脂肪細胞分化に関わる遺伝子の発現を抑制するとともに、脂肪前駆細胞が脂肪細胞化することを防ぐことに成功した。本研究は、将来的に肥満の治療法開発に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

dCas9融合ヒストン修飾酵素を用いた従来の研究では、ヒストンメチル化の人工編集による遺伝子発現の制御は困難だった。本研究では、標的遺伝子に複数のヒストン修飾酵素を動員するSunTag法を応用し、脂肪細胞化に関わる遺伝子の発現制御に成功した。また、実際に脂肪細胞化の抑制も可能で、将来的に肥満治療に応用できる可能性がある。本研究で用いた方法は、遺伝子情報の改変を伴わない点で安全である。また、SunTag法はCRISPR-Cas9を基礎とするため、様々な疾患治療で応用が検討されているRNA干渉より特定遺伝子の制御に向いており、遺伝子治療で問題となる非特異性に起因する副作用を克服できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Obesity accounts for 20-30% of the Japanese population and is a risk factor for lifestyle-related diseases. In this study, we aimed to inhibit differentiation of adipose progenitor cells into mature adipocytes by artificially controlling chemical modifications of histones that contribute to gene expression without altering the genetic information of the cells. This method successfully suppressed the expression of genes involved in adipocyte differentiation and prevented terminal differentiation into adipocytes by recruiting a histone modifying enzyme in the gene region that regulates adipocyte differentiation. This research is expected to contribute to the development of treatments for obesity in the future.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：脂肪細胞分化 ヒストンメチル化 SunTag法 SETDB1

1. 研究開始当初の背景

エピゲノムはDNA塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を変化させるシステムである。エピゲノムの一つに、ヒストン修飾を介した遺伝子発現制御機構がある。ヒストンは環境刺激に応じて、ヒストン修飾酵素によるアセチル化、メチル化、リン酸化などの修飾を受けることが知られている。これにより、クロマチン構造変化や転写関連因子複合体の動員が誘導されることで遺伝子発現が変化する。しかしながら、従来の研究で用いられてきたヒストン修飾酵素の阻害剤、強制発現あるいはノックダウンなどの実験手法では、ゲノムワイドなヒストン修飾変化を伴うことから、細胞分化や疾患形成において観察される「特定ゲノム領域のヒストン修飾変化の意義」が本質的に解明できていない。

脂肪細胞の分化に関する研究分野では、転写制御機構に加えてエピゲノム制御機構の解明が進んでいる。ヒストン修飾の中でも化学的に安定なメチル化を誘導する酵素の一つにヒストンH3K9メチル化酵素SETDB1がある。本研究室の稲垣らは、前駆脂肪細胞において、転写調節因子である*Cebpa*遺伝子と*Pparg*遺伝子の転写開始点直後の領域へのSETDB1の結合が同領域ヒストンのH3K9トリメチル化修飾を誘導し、*Cebpa*と*Pparg*の発現を低下させることで脂肪細胞分化を抑制することを報告した(引用[1])。しかし、このようなヒストン修飾を介した遺伝子発現制御を直接的に証明するためには、特定ゲノム領域のヒストン修飾を効率的に改変する技術を確認し、*Cebpa*遺伝子または*Pparg*遺伝子におけるヒストン修飾が本質的に脂肪細胞分化を抑制することを示す必要がある。

一方、ヒストン修飾酵素による遺伝子発現調節には、ヒストン修飾酵素の酵素活性の他にゲノム上でのヒストン修飾酵素を含むタンパク質複合体の形成が必要であることが報告されている(引用[2])。稲垣らはJMJD1AがH3K9の脱メチル化酵素として働くだけでなく、転写複合体形成の足場として機能することを示してきた(引用[3])。すなわち、特定ゲノム領域へのヒストン修飾酵素の動員による遺伝子発現調節を実現するためには、当該酵素が活性を発揮することに加え、当該酵素を含む転写調節複合体が適切に形成されて機能する必要があると考えられる。

そこで本研究では、SETDB1を含む様々なヒストンメチル化関連酵素を、SunTag法を用いて特定ゲノム領域に動員し、脂肪細胞分化の制御に関与する酵素をスクリーニングし同定することを目指した(図1A)。本学の畑田らは、酵素活性欠損Cas9(dCas9)とguide RNA(gRNA)によるゲノム標的技術と、GCN4抗原とscFv間の抗原抗体反応とを融合したSunTag法により、特定ゲノム領域に複数分子のDNA脱メチル化酵素TET1を動員することで遺伝子発現を顕著に変化させることに成功した(引用[4])。一方、SunTag法を用いてヒストン修飾を書き換えることで遺伝子発現の制御に成功した例はこれまで報告されていない。本研究では、SunTag法を応用し、*Cebpa*遺伝子座または*Pparg*遺伝子座にメチル化関連酵素を動員することでヒストン修飾を誘導する技術を確認するとともに、エピゲノムレベルでの脂肪細胞分化のメカニズム解明および制御を目指した(図1B)。

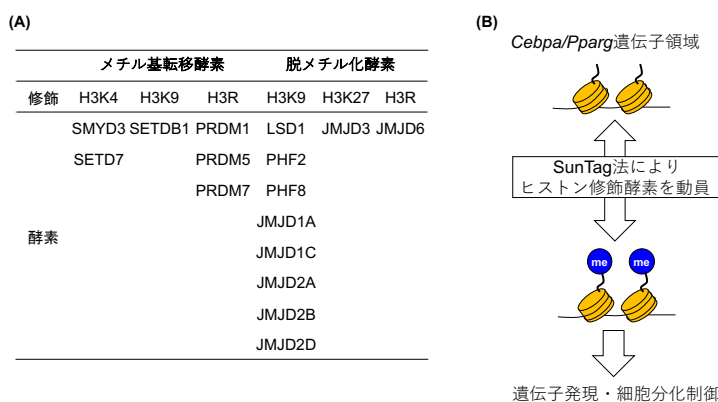


図1. 本研究が目指すSunTag法による脂肪細胞分化制御

(A) 本研究が標的とするヒストン修飾酵素。(B) SunTag法により標的遺伝子領域のヒストンメチル化状態を制御する。

2. 研究の目的

本研究では、下記の2項目を目的として実施した。

- (1) SunTag法によるメチル化関連酵素を介した特定ゲノム領域のヒストン編集技術の確立
- (2) SunTag法を用いた*Cebpa/Pparg*遺伝子座のヒストン編集による脂肪細胞の分化制御

3. 研究の方法

SunTag 因子 (dCas9-5xGCN4s または dCas9-10xGCN4s、および、scFvGCN4-sfGFP-ヒストン修飾酵素) を安定発現した 3T3-L1 細胞をレトロウイルスまたは *PiggyBac* システムを利用して作出した。さらに、安定発現細胞に対して *Pparg* 遺伝子または *Cebpa* 遺伝子のゲノム領域に対する gRNA 発現ユニットをレトロウイルス感染により安定発現させた。これらの細胞の脂肪細胞分化を誘導し、SunTag 因子を *Pparg* または *Cebpa* 遺伝子領域に動員することで脂肪細胞分化の制御を試みた。脂肪細胞の分化度の評価にあたっては、*Pparg* 遺伝子または *Cebpa* 遺伝子の発現を qPCR で評価 (分化開始後 2 日目または 4 日目) し、終末分化 (分化開始後 8 日) を Oil red O (ORO) 染色で確認した。また、SunTag 因子を動員したゲノム領域のヒストン修飾を評価する目的で ChIP-qPCR を行った。

4. 研究成果

脂肪細胞分化を制御できるヒストン修飾酵素を同定することを目的として、SunTag 因子 (dCas9-5xGCN4、scFvGCN4-sfGFP-ヒストン修飾酵素) を安定発現した細胞に対し、*Cebpa* 遺伝子および *Pparg* 遺伝子の転写開始点付近のゲノム領域を標的とする 27 個の gRNA を導入した。しかしながら、ORO 染色によって脂肪細胞分化を評価したところ、いずれのヒストン修飾酵素も対象群 (No enzyme) と比較して脂肪細胞分化への影響は確認できなかった (図 2)。

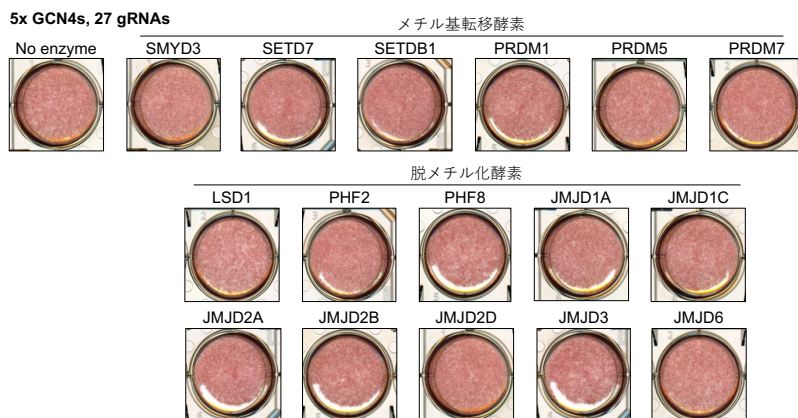


図2. SunTag因子安定発現細胞のORO染色による脂肪細胞分化の評価

5xGCN4sの発現細胞に各種ヒストン修飾酵素および27個のgRNAを導入した細胞における脂肪細胞分化

SunTag 法では、動員する酵素のサイズが大きいと構造的な競合が起こり、標的遺伝子領域の修飾効果が低下することが畑田らによって示唆されている。そこで、SETDB1 に着目し、酵素活性ドメイン (570-1291 a. a.) のみを用いて SunTag 法による脂肪細胞分化制御を試みた。*Cebpa* 遺伝子および *Pparg* 遺伝子をそれぞれ、または、両方を gRNA で標的したが、終末分化に対する影響は認められなかった (図 3A)。さらに、*Cebpa* 遺伝子および *Pparg* 遺伝子の遺伝子発現を調べたが、同様に SunTag 法による遺伝子標的の影響は認められない結果となった (図 3B)。

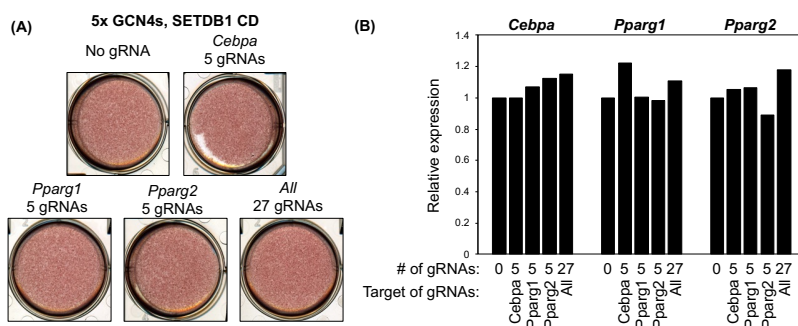


図3. SETDB1酵素活性ドメインを利用した場合の脂肪細胞分化制御

5xGCN4sおよびSETDB1酵素活性ドメイン (SETDB1CD) を利用したSunTag法。*Cebpa*、*Pparg1*、*Pparg2*をそれぞれ5個、または、これら3つの遺伝子全てを27個のgRNAで標的した。(A) ORO染色結果。(B) 各遺伝子の発現量。

そこで、抗原抗体反応の抗原として働く GCN4 の数に着目し、dCas9-10xGCN4 および scFvGCN4-sfGFP-Setdb1 の安定発現細胞に対して *Cebpa* 遺伝子の転写開始点付近の領域に対する gRNA を導入し、同様に ORO 染色によって評価した。その結果、対象群 (no gRNA) と比較して *Cebpa* 遺伝子に対する異なる二つの gRNA (gRNA#1、gRNA#2) をそれぞれ導入した細胞で脂肪細胞分化の抑制が確認できた。そこで、以降の実験では、SETDB1 を *Cebpa* 遺伝子領域に動員することで脂肪細胞分化が抑制されるメカニズムに注目して研究を実施した。*Cebpa* 遺伝子領域における SETDB1 動員が *Cebpa* 遺伝子および *Pparg* 遺伝子の発現に与える影響を qPCR で評価した。*Cebpa* 遺伝子に関しては、対象群 (no gRNA) と比較して gRNA 発現群 (gRNA#1 および gRNA#2) で遺伝子発現の低下を認めた (図 4A)。一方、*Pparg* 遺伝子でも同様に遺伝子発現低下が認められた (図 4A)。C/EBP α と PPAR γ は相互に遺伝子発現を制御する転写因子として働くことが知られていることから、SunTag 因子による *Cebpa* 遺伝子の発現変化に同調する形で *Pparg* 遺伝子の発現が変化することは合理的である。

次に、*Cebpa* 遺伝子領域への SETDB1 の動員が同領域の H3K9me3 レベルを制御するかについて検証を行った。本検証では、gRNA#1 の安定発現株を用いた。H3K9me3 レベルを ChIP-qPCR によって評価したところ、対象群 (no gRNA) と比較して gRNA#1 導入群で H3K9me3 レベルの上昇を認めた (図 4B)。一方、H3K9me3 レベルの変化が SETDB1 の酵素活性を介して誘導されることを確認するために、酵素活性欠失型 SETDB1 (K867R) を利用して評価を行った。その結果、gRNA#1 による酵素活性欠失型 SETDB1 (K867R) の動員では H3K9me3 レベルの上昇が起こらないことが確かめられた。

最後に、*Cebpa* 遺伝子領域への SETDB1 動員によって起こる *Cebpa* 遺伝子の発現変化が、SETDB1 の酵素活性を介して誘導されることを確認した。野生型 SETDB1 または変異型 SETDB1 (K867R) および gRNA#1 を安定発現した細胞の脂肪細胞分化を誘導し、分化開始後 4 日目の *Cebpa* 遺伝子発現を評価した。その結果、野生型 SETDB1 では対象群 (no gRNA) と比較して gRNA#1 発現群で *Cebpa* 遺伝子発現が低下する一方、変異型 SETDB1 (K867R) では対象群 (no gRNA) と比較して gRNA#1 発現群での遺伝子発現の低下が認められないことが明らかとなった (図 4C)。

以上により、我々は SunTag 法による SETDB1 を介した *Cebpa* 遺伝子ゲノム領域のヒストン編集技術を確立するとともに、この技術を用いて脂肪細胞の分化制御を実現した。

<引用文献>

- [1] Matsumura Y. et al. *Mol Cell*. **60**, 584-596 (2015).
- [2] Bannister AJ et al., *Cell Res*. **21**;381-395 (2011).
- [3] Abe Y et al., *Nat Commun*. **9**;1566 (2018).
- [4] Morita S. et al. *Nat Biotechnol*. **34**, 1060-1065 (2016).

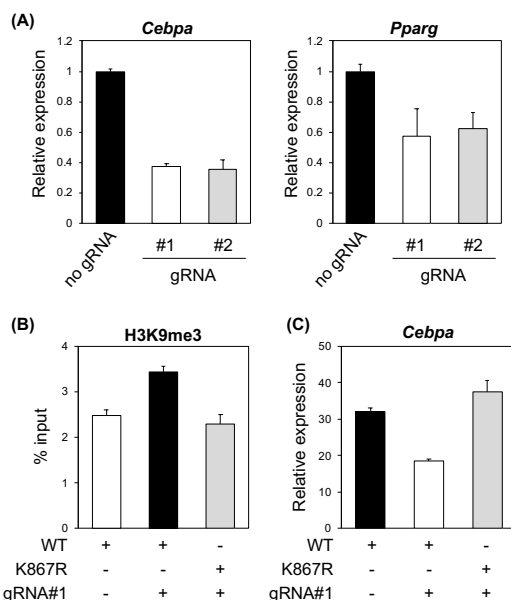


図4. *Cebpa* 遺伝子への SETDB1 動員の影響確認

(A) *Cebpa* 遺伝子への SETDB1 動員により、*Cebpa* 遺伝子および *Pparg* 遺伝子の発現が減少する。(B, C) *Cebpa* 遺伝子への SETDB1 動員により、*Cebpa* 遺伝子のゲノム領域の H3K9me3 レベル (B)、および、遺伝子発現 (C) が酵素活性依存的に変化する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木智大, Silvia Bolzani, 小松哲郎, Diana Vargas, Sharifur Rahman, 谷村恭子, 林真友子, 谷岡安紀子, 森田純代, 堀居拓郎, 畑田出穂, 柴田宏, 稲垣毅
2. 発表標題 エピゲノム編集による脂肪分化制御への挑戦
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tomohiro Suzuki, Tetsuro Komatsu, Hiroshi Shibata and Takeshi Inagaki	4. 発行年 2021年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 21
3. 書名 Metabolic Responses to Energy-Depleted Conditions	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------