

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22633

研究課題名（和文）生活習慣病の基盤となるエピゲノム記憶の人工的編集への挑戦

研究課題名（英文）Challenges in Artificial Editing of Epigenomic Memory Underlying Lifestyle-related Diseases

研究代表者

稲垣 毅（INAGAKI, Takeshi）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：10507825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪細胞の分化制御にはヒストンメチル化修飾が関与する。そのため、脂肪細胞分化関連遺伝子領域に特異的なヒストンメチル化修飾を人工的に制御することができれば、ひいては肥満症の治療戦略に繋がる可能性が考えられる。そのため本研究では、SunTag法を用いて標的遺伝子領域にヒストンメチル化酵素SETDB1を動員することに挑戦した。その結果、脂肪細胞分化のマスター制御因子であるCebpaをコードする領域のヒストンH3K9メチル化の程度が高値を示し、Cebpaの発現が抑制されることを見出した。また、この変化がSETDB1の酵素活性に依存することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飽食の時代を生きる私たちにとって、肥満症の制御は重要な課題である。脂肪を構成する脂肪細胞の分化の制御にはヒストンメチル化修飾というエピゲノム機構が関与する。本研究ではSunTag法を用いてヒストンメチル化酵素であるSETDB1を標的遺伝子領域に動員することで、脂肪細胞分化関連遺伝子であるCebpaの発現を制御することに挑戦し、遺伝子発現が抑制されることを見出した。この成果は、人工的に脂肪細胞のヒストンメチル化修飾を書き換えるための基盤技術を立ち上げたものであり、将来的に肥満症治療の新規戦略などへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Histone methylation is involved in the regulation of adipocyte differentiation. Therefore, artificial regulation of histone methylation is expected to affect gene expression related to adipocyte differentiation. In this study, we attempted to recruit the histone methyltransferase SETDB1 to a target genomic region using the SunTag method. We found that histone H3K9 methylation levels were increased in the region encoding Cebpa, a master regulator of adipocyte differentiation, and that Cebpa expression was suppressed. We also found that this change is dependent on the enzymatic activity of SETDB1.

研究分野：代謝エピジェネティクス

キーワード：エピゲノム SunTag法 ヒストンメチル化修飾

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム研究が進むにつれ、人工的編集技術をもちいたエピゲノム制御は重要な研究テーマとなってきた。しかし、ヒストンメチル化修飾の人工的制御による転写調節の成功例はほとんどなく、「抑制型ヒストンメチル化修飾の獲得は標的遺伝子の抑制に十分ではない」とする報告もみられる状況にあった (O'Geen et al. *Nucleic Acids Research* 2017)。

エピゲノムは脂肪細胞の分化や性質の制御に関与する。研究代表者らのグループは、脂肪細胞分化に関与する機構の一つとして、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) のメチル化修飾による制御機構を報告した (Matsumura et al. *Molecular Cell* 2016)。詳細には、転写促進のヒストン修飾マークである H3K4me3 と転写抑制のヒストン修飾である H3K9me3 からなる新規ビバレントヒストンマーク (H3K4/K9me3) が、白色脂肪細胞分化過程において前駆脂肪細胞を維持する機構であることを発見し、さらに H3K9me3 のメチル化酵素である SETDB1 が関与する機構を見出した。

2. 研究の目的

脂肪細胞の分化制御にはヒストンメチル化修飾が関与する。そのため、脂肪細胞分化関連遺伝子領域に特異的なヒストンメチル化修飾を人工的に制御することができれば、ひいては肥満症の治療戦略に繋がる可能性を考慮し、本研究において人工的なエピゲノム制御に挑戦することとした。

3. 研究の方法

特定遺伝子領域のエピゲノム情報を人工的に書き換えることを目指し、CRISPR-dCas9 システムを基盤とする SunTag 法を利用した。SunTag 法は、dCas9 (非活性型 Cas9 変異体) に結合させた複数の GCN4 タンパク質 (multi-GCN4) を、ガイド RNA (gRNA) を足場として標的遺伝子領域に結合させたのち、さらに GCN4 抗体の単鎖可変領域フラグメント (single-chain variable fragment: scFv) に結合させた目的酵素を目的の遺伝子領域に動員 (リクルート) する手法である (図 1)。本研究では、SunTag 法を用いてヒストンメチル化修飾酵素 SETDB1 を標的遺伝子 (*Cebpa*) 領域に動員し、脂肪細胞分化過程における遺伝子発現やヒストンメチル化修飾への影響を検討した (図 1)。

(1) SunTag 法

SunTag 法の実施のため、3 種のレトロウイルス調整用プラスミド (dCas9-multi-GCN4 発現プラスミド、scFv を結合させたヒストン修飾酵素 SETDB1 (scFv-SETDB1) の発現プラスミド、gRNA 発現用プラスミド) を作製した (群馬大学、畑田出穂教授の協力)。ウイルス感染後の選択的スクリーニングを可能にするため、各プラスミドに異なる種類の抗生物質耐性配列を組み込んだ (Zeocin, Bleomycin, Blasticidin S)。

(2) gRNA

脂肪細胞分化のマスター制御因子 (C/EBP α) をコードする遺伝子の周辺領域を標的とする gRNA を使用した。gRNA 配列については既報のものを参照するとともに、新規の gRNA 配列を Benchling ソフトウェア (<https://www.benchling.com/>) を用いて設計した。

(3) 安定発現細胞株の構築

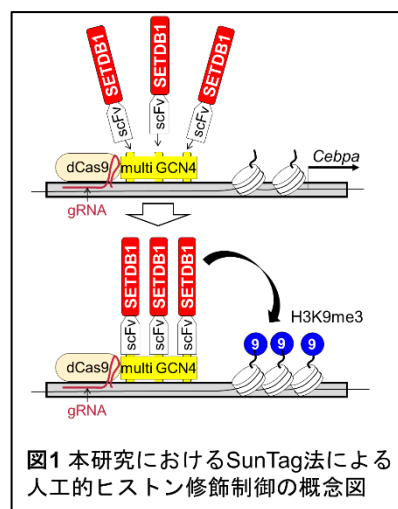
本研究では脂肪細胞の分化に影響を与える人工的エピゲノム編集の効果を検証するため、分化の過程にわたって安定的に SunTag 因子を発現する細胞株を構築した。レトロウイルス作製の PlatE 細胞に前述のプラスミドを導入してレトロウイルスを調整した。得られたレトロウイルスを脂肪前駆細胞に感染させたのち、抗生物質を用いて感染した細胞のスクリーニングを行った。3 種の要素 (dCas9-multi-GCN4 と scFv-SETDB1、gRNA) をそれぞれ発現させるためのレトロウイルスを一種類ずつ感染させたのち、抗生物質の耐性に基づく選択的スクリーニングを実施し、このサイクルを 3 回繰り返して実施することですべての要素を安定的に発現する細胞を構築した。

(4) 脂肪細胞分化制御結果の評価

エピゲノム編集効果の評価は、標的遺伝子発現と H3K9me3 メチル化修飾を基準として行った。標的遺伝子 (*Cebpa*) の mRNA 発現を RT-qPCR 法を用いて検討するとともに、クロマチン免疫沈降後のリアルタイム定量 PCR (RT-qPCR) 法 (ChIP-qPCR 法) を実施し、標的遺伝子領域の H3K9me3 メチル化修飾の程度を検討して評価した。

(5) 欠失変異体による検証

SunTag 法による *Cebpa* 遺伝子領域における H3K9me3 程度の増加と遺伝子発現抑制が、標的

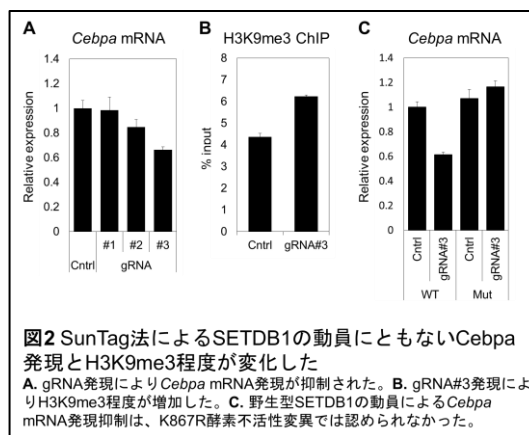


領域への人工的な SETDB1 のリクルートメントによって生じたことを検証するため、酵素不活性化点変異体および野生型を発現する細胞をそれぞれ準備し、比較検討を実施した。

4. 研究成果

本研究に先立ち、SunTag 法を用いてエピゲノム酵素の活性ドメインを標的領域に動員し、脂肪細胞分化に与える影響を検討した。その結果、明確な脂肪細胞分化への影響を確認することができなかった。その理由として、密なクロマチン構造をとることが知られている H3K9 のメチル化領域にエピゲノム酵素を動員することが困難であった可能性を考えた。本研究では、適切な条件を検討するため、二種類の dCas9-multi-GCN4 発現用プラスミドと二種類の scFv-VP64 発現用プラスミドを準備して基礎検討を行った。また、作用複合体形成に与える影響を考慮して酵素の全長配列を用いた。

(1) SunTag 法の各要素の適切な発現程度を検討するため、SETDB1 の代わりに VP64 を用いて基礎検討を実施した。「sv40 プロモータ下に dCas9-10xGCN および VP64 を発現させる系」と、「LTR プロモータ下に dCas9-5xGCN および VP64 を発現させる系」を比較したところ、前者で良好な標的遺伝子の発現を認めた (*Cebpa* 発現を指標として利用した)。さらに、VP64 の発現程度が与える影響を検討した結果、「sv40 プロモータ下に dCas9-10xGCN を発現させたうえで LTR プロモータ下に VP64 を発現させる系」が最適な条件であることを見出した。以下の検討は、この条件を用いて実施した。



(2) sv40 プロモータ下に dCas9-10xGCN を発現させたのち、LTR プロモータ下に SETDB1 を発現させて安定発現細胞株を樹立した。さらに、*Cebpa* 遺伝子の近傍領域に設計した3種のgRNA (gRNA#1、#2、#3) を発現するレトロウィルス进行调整して感染させ、抗生物質を用いた選択的スクリーニングを実施した。得られた細胞は、インスリン、デキサメタゾン、IBMXを含む脂肪細胞分化誘導カクテルを用いて分化誘導を行ったのち、リアルタイム qPCR(RT-qPCR)法で *Cebpa* の mRNA 発現程度を検討した。その結果、転写開始点近傍領域に設計したgRNA#3を用いた場合に、最も顕著に *Cebpa* の発現が抑制されることが見出された(図 2A)。上記の結果は、SunTag 法により標的遺伝子領域にリクルートメントにされた SETDB1 が、脂肪細胞分化過程における *Cebpa* 発現の抑制に関与したことを示すものであった。

(3) つぎに、SunTag 法による標的遺伝子領域への SETDB1 の動員が、H3K9me3 のメチル化制御に関与するかについて検証した。gRNA#3 を発現する脂肪前駆細胞 (sv40 プロモータ下に dCas9-10xGCN、LTR プロモータ下に SETDB1 を発現) の分化を誘導したのち、クロスリンク処理を施したうえで回収し、ChIP 用サンプルとした。DNA の断片化ののち、抗 H3K9me3 抗体 (東工大、木村宏先生から分与) を用いて ChIP を行い、*Cebpa* 領域周辺に設計したプライマーを用いて RT-qPCR 法を実施した。その結果、gRNA#3 発現細胞では対照群と比較して、*Cebpa* 領域における H3K9me3 が高い傾向が見出された(図 2B)。この結果は、SunTag 法で標的遺伝子領域にリクルートメントにされた SETDB1 によってヒストン H3K9 がメチル化されたことを支持する結果であった。

(4) 上記で認められた *Cebpa* 遺伝子領域における H3K9me3 程度の上昇が、SETDB1 の酵素活性に依存することを検証した。はじめに、SETDB1 の酵素不活性化点変異体を発現する細胞系の確立に取り組んだ。SETDB1 の 867 番目のリジンを変異 (K867R) させると酵素活性が著しく低下することを示した先行論文に倣い(Ishimoto K et al. *PLoS One* 2016)、野生型 SETDB1 (WT-SETDB1) もしくは K867R 変異型 SETDB1 (Mut-SETDB1) に scFv を結合させた発現プラスミドを準備し、SunTag 法の3要素すべてが発現する脂肪前駆細胞株を樹立した。樹立した細胞を分化誘導したのち、RT-qPCR 法を用いて *Cebpa* の mRNA 発現を検討した結果、SETDB1 の酵素活性に依存する転写抑制を認めた(図 2C)。また、細胞をクロスリンクしたのちに ChIP 用サンプルとして回収し、抗 H3K9me3 抗体を用いた ChIP-qPCR 法を実施して *Cebpa* 遺伝子近傍領域におけるメチル化程度を検討した結果、scFv-WT-SETDB1 発現細胞ではgRNA#3の発現によって H3K9me3 程度が高値を示すのに対し、scFv-Mut-SETDB1 発現細胞においてはgRNA#3の発現によって H3K9me3 が高値を示す傾向は認められなかった。

以上のように、SunTag 法を用いて人工的にエピゲノム酵素 SETDB1 を動員し、脂肪細胞分化のマスター制御遺伝子である *Cebpa* 領域のヒストンメチル化程度を変化させて発現抑制に導いた。今後もひきつづきの検証を続け、適切な条件検討に努めていく所存であるが、本研究の成果により、人工的にエピゲノムを制御して細胞の性質を制御できる可能性が開かれた。

<引用文献>

- ① O'Geen H. et al. "dCas9-based epigenome editing suggests acquisition of histone methylation is not sufficient for target gene repression." *Nucleic acids research* 45.17 (2017): 9901-9916.
- ② Matsumura Y. et al. "H3K4/H3K9me3 bivalent chromatin domains targeted by lineage-specific DNA methylation pauses adipocyte differentiation." *Molecular cell* 60.4 (2015): 584-596.
- ③ Ishimoto K. et al. "Ubiquitination of lysine 867 of the human SETDB1 protein upregulates its histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase activity." *PLoS One* 11.10 (2016): e0165766.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Tomohiro, Hayashi Mayuko, Komatsu Tetsuro, Tanioka Akiko, Nagasawa Masahiro, Tanimura-Inagaki Kyoko, Rahman Mohammad Sharifur, Masuda Shinnosuke, Yusa Kosuke, Sakai Juro, Shibata Hiroshi, Inagaki Takeshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Measurement of the nuclear concentration of α -ketoglutarate during adipocyte differentiation by using a fluorescence resonance energy transfer-based biosensor with nuclear localization signals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1429 ~ 1438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ21-0255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 稲垣 毅、酒井寿郎
2. 発表標題 アドレナリンシグナルと熱アドレナリンシグナルと熱産生性脂肪のepigenetics産生性脂肪のepigenetics
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣 毅
2. 発表標題 栄養と外部環境による脂肪のエピゲノム制御
3. 学会等名 第105回 日本栄養食糧学会関東支部大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣 毅
2. 発表標題 脂肪細胞の性質を制御する環境記憶のエピジェネティクス
3. 学会等名 第41回日本肥満学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣 毅
2. 発表標題 環境記憶のエピゲノム機構
3. 学会等名 第66回北関東医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣 毅、酒井寿郎
2. 発表標題 A Chromatin Conformation-Dependent Regulation of Adipocyte Characteristics by JMJD1A
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会シンポジウム（Molecular basis of phenotypic variation regulated by epigenome）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣 毅、酒井寿郎
2. 発表標題 熱産生性脂肪のエピジェネティクス
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Inagaki
2. 発表標題 Epigenetic Regulation of Adipose Cell Fate and Function
3. 学会等名 The 9th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism in conjunction with the 40th Annual Scientific Meeting of the Korean Endocrine Society (SICEM 2021)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所 https://www.imcr.gunma-u.ac.jp/ 群馬大学生体調節研究所代謝エピジェネティクス分野 https://epigenetics.imcr.gunma-u.ac.jp/ 群馬大学生体調節研究所 https://www.imcr.gunma-u.ac.jp/ 群馬大学生体調節研究所代謝エピジェネティクス分野 https://epigenetics.imcr.gunma-u.ac.jp/
--

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
---------	---------