

# エピゲノム編集による脂肪蓄積の制御に関する研究

東京大学 先端科学技術研究センター 代謝医学分野

松村 欣宏

## 1. はじめに

【緒言】メタボリックシンドロームなどの生活習慣病は多因子性疾患であり、その発症メカニズムの解明は高齢化が進む先進国において大きな課題となっている。近年、後天的に書き換えられる遺伝情報（エピゲノム）が、疾患の発症に関与することが着目されている。エピゲノムはクロマチン構造と遺伝子発現を制御し、細胞の分化や機能を制御する。生活習慣や食習慣などの環境要因はエピゲノムとして細胞に記憶され、脂肪を蓄積しやすい、あるいは燃焼しやすい体質を作っていると考えられる。脂肪細胞は全身のエネルギー代謝を司り、その生理的機能の破綻は、糖尿病や動脈硬化の発症の大きな原因の一つである。しかし、エピゲノムを介して脂肪細胞のエネルギー代謝がどのように制御されているかは、いまだ不明な点が多く残されている。

【目的】本研究では、ゲノム編集技術CRISPR-Cas9システムを応用し、脂肪細胞のエピゲノム編集を行うことにより、エピゲノムを介した脂肪蓄積のメカニズムを理解し、制御することを目的とする。本研究で得られる成果はメタボリックシンドロームの予防・治療への足がかりとなる。

【背景】DNAメチル化やヒストン修飾などのエピゲノムは、クロマチン構造と遺伝子発現を制御し、細胞の運命を決定する (Margueron R et al. 2005)。ヒストンアセチル化は転写促進に、DNAメチル化は一般的に転写抑制に働く。一方、ヒストンのメチル化は修飾される部位により正あるいは負に遺伝子発現を制御する。ヒストンH3K4メチル化は転写を促進するのに対し、ヒストンH3K27メチル化、ヒストンH3K9メチル化は転写を抑制する。ES細胞では転写促進のH3K4メチル化と抑制のH3K27メチル化からなるビバレントクロマチンドメインが、発生に関わる遺伝子の発現を低く保ち、多分化能を維持する (Bernstein BE et al. 2006)。一方、細胞の運命が方向づけられた前駆細胞ではH3K4メチル化と転写抑制のH3K9メチル化からなるビバレントクロマチンドメインが、終末分化に必要な遺伝子 (*Cebpa*, *Pparg*) の発現を低く保ち、分化が必要な時まで未分化状態を維持する (Matsumura Y et al. 2015)。エピゲノムを介した細胞分化・運命決定機構については研究がなされてきた。しかしエピゲノムを操作することにより、遺伝子発現、細胞機能をどの程度制御できるかは明らかとなっていない。

CRISPR-Cas9システムは、ガイドRNA (gRNA) を用いて遺伝子座特異的にDNA切断酵素Cas9をリクルートさせることで、ゲノムDNAを編集する技術である (Cong L et al. 2013)。CRISPR-Cas9システムを応用したエピゲノム編集により、遺伝子座特異的にヒストンのアセチル化を行い、遺伝子の発現を制御することができると報告された (Hilton IB et al. 2015)。エピゲノム編集ではDNA切断活性を持たないCas9 (dCas9) にエフェクターとしてヒストン修飾酵素あるいは酵素活性ドメインを融合することで、遺伝子座特異的にエピゲノムを編集する技術である。つい最近では、遺伝子座特異的にヒストンH3K4のメチル化、脱メチル化を行ったエピゲノム編集が報告されている (Cano-Rodriguez D et al. 2016; Molina O et al. 2016)。脂肪細胞の機能改善、メタボリックシンドロームの予防・治療の観点から、脂肪蓄積に関する白色脂肪細胞でのエピゲノム編集技術の確立が求められている。

## 2. 方法

【細胞培養】3T3-L1前駆脂肪細胞は基礎培地（10%ウシ胎子血清およびペニシリン-ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)）で培養を行った。分化誘導には、1  $\mu\text{g/ml}$  インスリン、0.25  $\mu\text{M}$  デキサメタゾン、0.5 mM IBMXを含む基礎培地で2日間培養を行い、1  $\mu\text{g/ml}$  インスリンを含む基礎培地で2日間培養を行い、さらに基礎培地で4日間培養を行った (Matsumura Y et al. 2015)。オイルレッドO (ORO) による脂肪滴の染色は、分化8日目に行った。

【レトロウイルス感染】レトロウイルス発現プラスミドpMXs-IRES-puroに、FLAG-tagのついたdCas9、またはエフェクターとしてKDM4AおよびKDM4Cの酵素活性ドメイン (aa 1-350) を融合させたdCas9を挿入し、pMXs-FLAG-dCas9-IRES-puro、pMXs-FLAG-dCas9-KDM4A-IRES-puro、pMXs-FLAG-dCas9-KDM4C-IRES-puroを作製した。*Cebpa*遺伝子の+486, +599, +892, +1,092, あるいは+1,463に特異的なgRNAを設計し、pReps-gRNA (*Cebpa* +486, +599, +892, +1,092, あるいは+1,463) を作製した。各種レトロウイルス発現プラスミドをPlatE細胞にトランスフェクションし、培養上清をレトロウイルス溶液として使用した。3T3-L1前駆脂肪細胞にレトロウイルスを感染させ、ピューロマイシンとG418で薬剤選択を行った。

【siRNAトランスフェクション】3T3-L1前駆脂肪細胞に、RNAiMax reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて*Kdm4a*, *Kdm4c*を標的としたStealth Select siRNA (Thermo Fisher Scientific) をトランスフェクションした。

【イムノブロット】細胞からWhole Cell Lysate (WCL) を調整し、一定分量をイムノブロットに供した。1次抗体にはマウス抗FLAG M2抗体 (Sigma) あるいはマウス抗アクチン抗体 (Sigma) を使用し、2次抗体にはHRP標識されたヤギ抗マウスIgG抗体 (Sigma) を使用した。シグナル検出にはSuperSignal化学発光基質 (Thermo Fisher Scientific) とImageQuant LAS (GEヘルスケア) でを使用した。

【RNA調製とcDNA合成】 Total RNAはISOGEN（ニッポンジーン）を用いて調製し、オリゴdTプライマーとSuperScriptII逆転写酵素（Thermo Fisher Scientific）を用いてcDNA合成を行った。

【クロマチン免疫沈降】 細胞は1%ホルムアルデヒドにより室温で10分間固定し、回収した。低張液で細胞を破碎、核画分を調整し、超音波（20秒×4回、10秒×1回）によりDNAを断片化した。クロマチン免疫沈降（ChIP）には抗FLAG M2抗体磁気ビーズ（Sigma）あるいは抗H3K9me3抗体（2F3）を結合させたDynabeads Protein G（Thermo Fisher Scientific）を使用した。ChIP DNAは、QIAquick PCR Purification Kit（Qiagen）を用いて精製した。DNA濃度はQubit FluorometerとdsDNA HS Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて定量した。

【リアルタイム定量PCR】 リアルタイム定量PCRの解析は、ABI PRISM Genetic Analyzerで行った。cDNAあるいはChIP DNAは適宜希釈し、遺伝子特異的なプライマーとSYBR Green色素を用いて定量を行った。mRNAの発現は、*Ppib*遺伝子を用いて標準化を行った。FLAG、およびH3K9me3のChIPには、*Ppib*遺伝子をネガティブ領域として使用した。

### 3. 結果

ヒストン脱メチル化酵素KDM4ファミリーに属するKDM4A, KDM4CはH3K9me3に対して脱メチル化活性を示すことが知られている（Whetstine JR et al. 2006）。脂肪細胞分化過程における*Cebpa*の遺伝子発現誘導に、KDM4A, KDM4Cが関与するかを明らかにするために、siRNAを用いたノックダウンを行った。KDM4AあるいはKDM4Cのノックダウンにより、*Cebpa*の発現誘導が抑制された（図1A）。また、KDM4AあるいはKDM4Cのノックダウンにより、脂肪滴の蓄積が抑制された（図1B）。これらの結果は、H3K9ヒストン脱メチル化酵素KDM4A, KDM4Cは*Cebpa*の遺伝子発現誘導と脂肪滴蓄積を促進することを示唆する。

3T3-L1前駆脂肪細胞では、*Cebpa*遺伝子の転写開始点下流1 kb近傍にH3K9me3修飾が認められる（Matsumura Y et al. 2015）。この遺伝子領域をエピゲノム編集の標的とするために、5つのgRNAを設計した（図2A）。3T3-L1前駆脂肪細胞において、レトロウイルスを用いてgRNAとエフェクター無しのFLAG-dCas9の両方を発現させた。抗FLAG抗体を用いたChIPにより、3つのgRNAにおいてFLAG-dCas9の*Cebpa*遺伝子へのリクルートが見られた（図2B）。その中でもgRNA (*Cebpa* +892)では、最も良くFLAG-dCas9がリクルートされた。これらの結果は、前駆脂肪細胞において、gRNAを用いてdCas9を*Cebpa*遺伝子にリクルートできることを示す。以降の実験では、gRNA (*Cebpa* +892)を用いる。

次に、3T3-L1前駆脂肪細胞において、gRNA (*Cebpa* +892)とFLAG-dCas9あるいはFLAG-dCas9-KDM4Cの両方を発現させた。免疫ブロットにより、dCas9あるいはdCas9-KDM4Cの発現が確認された（図3A）。H3K9me3の定量ChIP-PCRでは、Emptyウイルスを感染させたコントロール細胞、dCas9発現細胞では、*Cebpa*遺伝子において分化依存的なH3K9me3の低下が見られた（図3B）。一方、dCas9-KDM4C発現細胞では、分化誘導前からコントロール細胞やdCas9発現細胞に比べH3K9me3が低下していた。この結果は、gRNA (*Cebpa* +892)とdCas9-KDM4Cの同時発現は、*Cebpa*遺伝子のH3K9me3の脱メチル化を促進することを示唆する。定量PCRにより*Cebpa*のmRNA発現を解析すると、コントロール細胞、dCas9発現細胞、dCas9-KDM4C発現細胞において、分化に伴う同様の発現誘導が見られた（図3C）。オイルレッドO染色では、コントロール細胞、dCas9発現細胞、dCas9-KDM4C発現細胞において、同様の脂肪滴蓄積が見られた（図3D）。これらの結果は、3T3-L1細胞におけるgRNA (*Cebpa* +892)とdCas9-KDM4Cの同時発現は、*Cebpa*遺伝子でのH3K9me3の脱メチル化は促進するが、*Cebpa*遺伝子発現と脂肪滴蓄積は促進しないことを意味する。

#### 【研究成果】

- ・ H3K9脱メチル化酵素KDM4A, KDM4Cは*Cebpa*の発現誘導と脂肪蓄積を促進することを明らかにした。
- ・ 3T3-L1前駆脂肪細胞において、gRNAとdCas9-KDM4Cを同時発現させるレトロウイルスの系を確立した。
- ・ gRNA (*Cebpa* +892)とdCas9-KDM4Cの同時発現により、*Cebpa*遺伝子のH3K9me3脱メチル化に成功した。

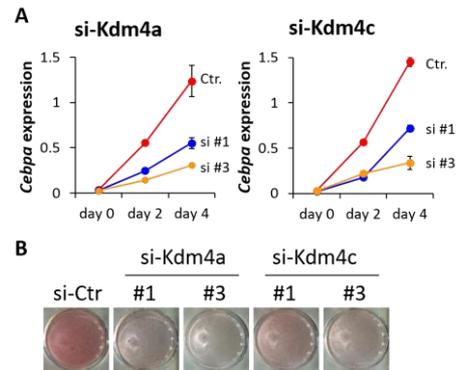


図1 H3K9 脱メチル化酵素KDM4A, KDM4Cのノックダウン (A) 定量 PCR 解析 (B) オイルレッドO染色

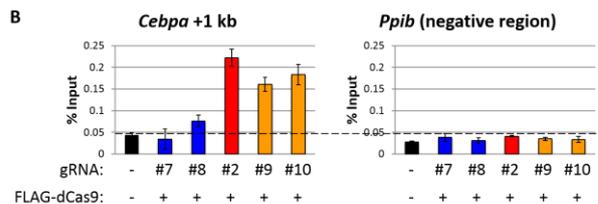
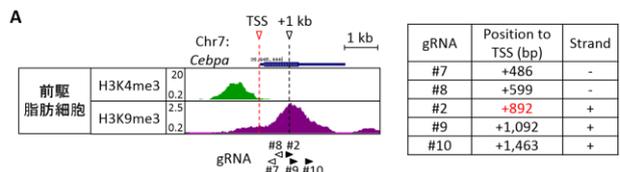


図2 *Cebpa*に対するgRNAの設計とdCas9のリクルートメント (A) *Cebpa*のヒストンメチル化と設計したgRNA (B) 抗FLAG抗体を用いた定量ChIP-PCR

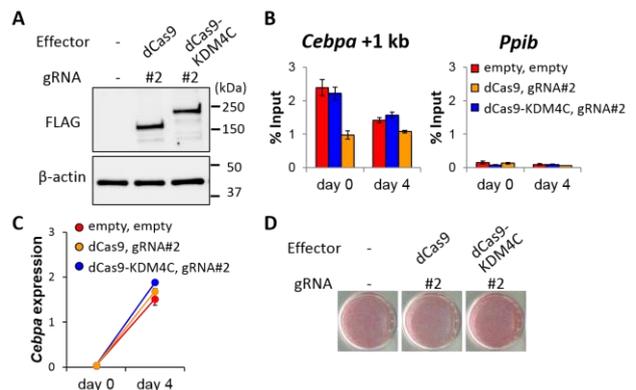


図3 KDM4Cによるエピゲノム編集 (A) イムノブロット (B) 抗H3K9me3抗体を用いた定量ChIP-PCR (C) 定量PCR解析 (D) オイルレッドO染色

#### 4. 考察

脂肪細胞分化はマスター転写因子であるC/EBP $\alpha$ とPPAR $\gamma$ により制御される。前駆脂肪細胞において、*Cebpa*、*Pparg*遺伝子では転写促進に働くH3K4メチル化、転写抑制に働くH3K9メチル化からなるビバレントクロマチドメインが形成され、遺伝子発現が低く保たれている (Matsumura Y et al, 2015)。エピゲノムは後天的なゲノム修飾であり、環境要因によって制御される。*Cebpa*、*Pparg*遺伝子のエピゲノムを操作することにより、遺伝子発現と脂肪細胞の脂肪蓄積を制御できる可能性がある。本研究では、ヒストンH3K9の脱メチル化酵素KDM4A、KDM4Cについてノックダウンの実験を行った。前駆脂肪細胞においてKDM4A、KDM4Cをノックダウンすると、*Cebpa*遺伝子の発現誘導と脂肪的の蓄積が抑制されたことから (図1)、これらヒストン脱メチル化酵素が*Cebpa*上でH3K9me3の脱メチル化を制御することが示唆される。今後、KDM4A、KDM4Cをノックダウンした際の、H3K9me3レベルをChIPで解析することにより、これらヒストン脱メチル化酵素によるH3K9me3脱メチル化を確認する必要がある。

エピゲノム編集は、DNA切断活性を持たないCas9 (dCas9) にエフェクターとしてヒストン修飾酵素あるいは酵素活性ドメインを融合し、gRNAを用いて遺伝子座特異的にリクルートすることで、エピゲノムを編集する技術である。本研究では、dCas9とgRNAを発現する2種類のレトロウイルスを用いることで、3T3-L1前駆脂肪細胞においてエピゲノム編集を行う系を構築した。*Cebpa*遺伝子においてH3K9me3修飾が認められる転写開始点下流1 kb近傍に5種類のgRNAを設計し、dCas9のリクルートを試みた。その結果、3種類のgRNAにおいて、*Cebpa*遺伝子へのdCas9のリクルートが確認された (図2)。2種類のgRNAではdCas9のリクルートが見られなかった原因として、H3K9me3修飾による閉じたクロマチン構造がdCas9のリクルートを阻害していることが考えられる。

*Cebpa*遺伝子に最も効率よくdCas9をリクルートしたgRNA (*Cebpa* +892) と、エフェクターとしてKDM4Cの酵素活性ドメインを融合させたdCas9を用いて、H3K9me3のエピゲノム編集を試みた。dCas9-KDM4Cのリクルートにより前駆脂肪細胞において*Cebpa*遺伝子のH3K9me3レベルが低下したことから (図3)、H3K9me3のエピゲノム編集に成功したと考えられる。しかし予想に反し、*Cebpa*遺伝子の発現誘導、脂肪滴の蓄積の促進は認められなかった。このことは前駆脂肪細胞において*Cebpa*遺伝子のH3K9me3の脱メチル化だけでは、遺伝子発現誘導が起こらないことを示唆する。一方、*Cebpa*のH3K9メチル化に関わるヒストンメチル化酵素SETDB1のノックダウンでは、*Cebpa*遺伝子のH3K9me3が低下し、遺伝子発現が誘導される (Matsumura Y et al. 2015)。SETDB1のノックダウンでは、H3K9me3の低下だけでなく、H3K4me3の転写開始点下流への浸潤、H3K27アセチル化の亢進が見られることから、H3K9メチル化、H3K4メチル化、H3K27アセチル化が連携した複雑なエピゲノム制御機構を介して、*Cebpa*遺伝子発現が制御されると考えられる。今回確立した3T3-L1前駆脂肪細胞におけるエピゲノム編集技術は、複雑なエピゲノム制御機構を解明するのに役立つと期待される。

#### 【まとめ】

本研究により、3T3-L1前駆脂肪細胞においてエピゲノム編集が初めて可能となった。*Cebpa*遺伝子のH3K9me3の脱メチル化だけでは、遺伝子発現は誘導されないことから、*Cebpa*の遺伝子発現はH3K9me3と他のヒストン修飾が絡んだ複雑なエピゲノム機構により制御されることが示唆される。

#### 5. 発表論文

なし (投稿論文準備中)。

#### 【参考文献】

- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125, 315-326.
- Cano-Rodriguez D, Gjaltema RA, Jilderda LJ, Jellema P, Dokter-Fokkens J, Ruiters MH, Rots MG (2016) Writing of H3K4Me3 overcomes epigenetic silencing in a sustained but context-dependent manner. *Nat Commun*, 7, 12284.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-823.
- Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, 33, 510-517.
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*, 15, 163-176.
- Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, Yoshida A, Kano Y, Kimura H, Tanaka T, Tsutsumi S, Nakao M, Doi T, Fukami K, Osborne TF, Kodama T, Aburatani H, Sakai J (2015) H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-Specific DNA Methylation Pauses Adipocyte Differentiation. *Mol Cell*, 60, 584-596.
- Molina O, Vargiu G, Abad MA, Zhiteneva A, Jeyaprakash AA, Masumoto H, Kouprina N, Larionov V, Earnshaw WC (2016) Epigenetic engineering reveals a balance between histone modifications and transcription in kinetochore maintenance. *Nat Commun*, 7, 13334.
- Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolnikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*, 125, 467-481.