

代謝エピジェネティクス

群馬大学生体調節研究所代謝エピジェネティクス分野

稲垣 毅

1. はじめに

細胞内代謝環境はエピゲノムに記憶される。しかし、代謝記憶の詳細な機構は不明であり、記憶されたエピゲノム暗号の「文章」を解読し、人工的に書き換えることができるのかどうかについては、未解明な点が多い。たとえば、栄養過多の環境では白色脂肪における脂肪蓄積が増大し、長期の寒冷環境では熱を産生するためにエネルギー消費が活発になり、糖代謝のトリカルボン酸 (TCA) 回路などが亢進するとともに白色脂肪は褐色脂肪様に形質転換し(ベージュ化)、エネルギーの蓄積臓器から消費臓器へとシフトする。そのため、脂肪細胞をモデルとしてエピゲノム暗号文章の書き込み・解読・書き換えについて研究したいと考えた。

TCA回路の中間代謝産物である2-オキシグルタル酸 (2-oxoglutaric acid (2OG)、 α ケトグルタル酸 (α -ketoglutaric acid (α KG)))は、JMJD型ヒストン脱メチル化酵素の活性に必須な補酵素であり、メチル化修飾は化学的に安定した可塑性のあるエピゲノム修飾であることから、環境適応における細胞の形質転換に関与すると予想される(発表論文 1, 2、参考論文 1)。つまり、核内の α KG濃度はさまざまなヒストン脱メチル化酵素の活性に影響を与え、その結果として書き換えられた複数のヒストンマークの組み合わせが標的遺伝子の発現を制御し、最終的にベージュ化が起こると考えられる。

本研究では、脂肪細胞の核内2OG濃度測定系を世界で初めて立ち上げ、その変化に伴って書き換えられるヒストン修飾の組み合わせ(「マルチバレントヒストンコード」と命名)を「文章」として解読し、人工的な脂肪細胞の形質制御に挑戦した。

2. 方法

(1) 2OG測定系

植物や古細菌などでは、窒素固定・アンモニア同化にともなうグルタミン産生において2OGが重要である。とくに、ニトロゲナーゼ転写制御因子NifAは2OG濃度を直接感知することが知られている。NifAの解離定数は約60 μ M以下、JMJD型ヒストン脱メチル化酵素のKd値が20 μ M程度と考えられる。そのため、NifAの部分配列を用いた蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) システムを構築することを目的として、2OG結合ドメインをコードする領域を挟むようにEYFP、ECFP配列を組み込んだ配列をCMVプロモーターの下流に組み込んだプラスミドを作製し、エレクトロポレーション法をもちいて脂肪細胞系に導入した。

上記により作製した「EYFP-2OG結合ドメインコードする領域-ECFP配列を組み込んだプラスミド」を安定的に発現する細胞株を得るため、PiggyBacシステムを利用した。FRET強度は、蛍光顕微鏡を用いて観察し、EYFP/ECFP比として解析した。画像データの解析法については、ImageJを用いてそれぞれの画像を8ビットに変更したのちイメージをスタックし、比率表示にしたうえで一細胞毎の解析を実施した。

(2) 網羅的ヒストン修飾解析法

網羅的なヒストン修飾解析を実施するため、質量分析を用いた手法に取り組み、脂肪細胞からヒストンを精製したのち、アルキル化、トリプシン消化して質量分析計にかけ、解析ソフトウェアによるヒストンテール断片の修飾同定を試行した。

(3) 人工的なH3K9メチル化制御

人工的なH3K9メチル化制御に関しては、CRISPR-Cas9法を基盤とするSunTag法(参考文献 2)による脂肪細胞分化特異的遺伝子領域へのメチル化酵素リクルートメントシステムを構築した。ガイドRNA (gRNA) は Benchling softwareを用いて設計し、機能性を確認するためにT7エンドヌクレアーゼ法を実施した。詳細には以下のように行った。gRNA発現プラスミドを作製し、ヒトCas9強制発現プラスミドとともにES細胞もしくは3T3-L1細胞にリポフェクタミン法を用いて導入し、48時間後に回収した。回収した細胞をプロテアーゼKで処理したのち、ゲノムDNAを精製し、これをテンプレートとして2回のPCR法を実施し、2%アガロースゲルに電気泳動してPCR産物DNA量を推定した。300 ngのDNAを熱編成、アニーリングののちにT7エンドヌクレアーゼで処理したうえで、2%アガロースゲルに電気泳動し、gRNAによる切断効率を計算した。

gRNAのほかにDNA切断酵素Cas9の不活性型 (dCas9) とGCN4タンパク質を複数結合して発現させ (SunTag)、また、抗GCN4抗体 (scFvドメイン) とエピゲノム酵素を結合させて発現させることで、抗原抗体反応を利用したエピゲノム酵素のリクルートメントに挑戦した。発現タンパク質の発現レベルはイムノブロット法を用いて検討した。また、SunTag法の結果として脂肪細胞分化に与える影響については、デキサメタゾン、インスリン、IBMXを用いて分化誘導を実施したうえで、Oil Red O染色法およびリアルタイムqPCR法を実施して標的遺伝子のmRNA発現を解析して検討した。

3. 結果

脂肪細胞培養液中にジメチル2OGの添加や前駆物質となるクエン酸の添加を行うことで、濃度依存的なFRET比の変化が確認され、新規の2OG酸濃度測定プローブを用いた2OG濃度の定性的測定に成功した。脂肪細胞分化過程における2OGの濃度変化については、安定的な発現細胞株の樹立が必要であると考えられた。しかし、FRETバイオセンサーの欠点として安定細胞株樹立が困難であることがあげられる。ウィルスを用いると逆転写反応時にCFP,YFP遺伝子間に組換えが起こることで片方のみが光るため、PiggyBac法を用いたレトロトランスポゾンシステムによる安定発現株を作製し、脂肪細胞分化過程における2OG濃度測定系を構築することに成功した。質量分析を用いたヒストン修飾解析に関しては、脂肪細胞分化前後に変化する網羅的同定結果を得ることに成功した。

SunTag法を用いたエピゲノム編集に関しては、レトロウィルスを用いたgRNAによるエピゲノム酵素リクルートメントによる脂肪細胞分化制御を検討した。Pparg1領域に設計した3種のgRNAについては、ES細胞での検討結果で30-40%程度の切断効率を確認した。クロマチン構造がより閉じた状態にあると考えられる3T3-L1細胞においては、ES細胞との比較においては若干切断効率の低下を認めたものの切断が確認された。SunTag法の構成因子であるdCas9結合抗原、scFv抗体結合酵素の発現を確認した。以上のように、gRNAの機能性が確認され、SunTag因子の安定発現株の樹立に成功したが、脂肪細胞分化程度や脂肪細胞分化関連遺伝子発現への影響は認められなかった。そのため、複数のgRNAを同時に導入することとし、Pparg1領域およびCebpa領域にそれぞれ9個のgRNAを設計して発現プラスミドを作製、導入したが、脂肪細胞分化および脂肪細胞分化関連遺伝子発現への影響を認めなかった。

4. 考察、まとめ

この度、アステラス病態代謝研究会助成をうけ、エピゲノム制御に関与する細胞内代謝物の測定系確立を目指して成功した。今後、詳細な濃度依存性の検討を進めるとともに、種々の細胞状態や代謝関連酵素欠損細胞などを用いた解析を進め、細胞内代謝物とエピゲノム変化の関連性の解明を進める。今後の検討事項として、細胞内代謝物の定量的測定、細胞の分化によるプローブ発現の不安定性の改善が挙げられる。また、質量分析を用いたヒストン修飾解析法を立ち上げることができたため、今後、サンプル数を増やして特異的なヒストン修飾の同定を実施する。

人工的エピゲノム編集法に関する最近の報告では、ヒストン修飾酵素の活性化ドメインのみをリクルートすることでヒストン修飾を変化させても遺伝子発現変化を認めなかったとするものがみられ(参考文献 3)、ヒストン修飾が単なる転写のマークであるのか制御因子であるのか、その両方の機能を持ちうるのかについてはいまだ不明な点が残る。我々は、ヒストン修飾酵素の標的部位へのリクルートメントに重要な複合体修飾を報告しており、今回の結果は複合体形成の重要性を表したものと捉えることもできる(発表論文 1, 2, 参考文献 4-6)。今後、酵素のリクルートメントとヒストン修飾変化の検証を進めつつ、解決策を見出したい。

5. 文献

発表論文 (*Corresponding author)

- 1) Tanimura K., Suzuki T., Vargas D., Shibata H., Inagaki T. * (2018). Epigenetic regulation of beige adipocyte fate by histone methylation. *Endocr. J.* (Accepted for publication)
- 2) Inagaki T.* (2018). Histone demethylases regulate adipocyte thermogenesis. *Diabetol. Int.* 9(4): 215-223.

参考文献

- 1) Inagaki T., Sakai J, Kajimura S.* (2016). Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipocyte cell fate and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(8):480-95.
- 2) Morita S., Noguchi H., Horii T., Nakabayashi K., Kimura M., Okamura K., Sakai A., Nakashima H., Hata K., Nakashima K., Hatada I.* (2016). Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nature Biotechnology* 34(10):1060-1065.
- 3) O'Geen H., Ren C., Nicolet C.M., Perez A.A., Halmi J., Le V.M., Mackay J.P., Farnham P.J., Segal D.J. * (2017). dCas9-based epigenome editing suggests acquisition of histone methylation is not sufficient for target gene repression. *Nucleic Acids Research.* 29;45(17):9901-9916.
- 4) Abe Y., Fujiwara Y., Takahashi H., Matsumura Y., Sawada T., Jiang S., Nakaki R., Uchida A., Nagao N., Naito M., Kajimura S., Kimura H., Osborne T.F., Aburatani H., Kodama T., Inagaki T.*, Sakai J. * (2018). Histone demethylase 1 JMJD1A coordinates acute and chronic adaptation to cold stress via thermogenic phospho-switch. *Nature Communications* 19;9(1):1566.

5) Abe Y., Rozqie R., Matsumura Y., Kawamura T., Nakaki R., Tsurutani Y., Tanimura-Inagaki K., Shiono A., Magoori K., Nakamura K., Ogi S., Kajimura S., Kimura H., Tanaka T., Fukami K., Osborne T.F., Kodama T., Aburatani H., Inagaki T.*, Sakai J.* (2015). JMJD1A is a signal-sensing scaffold that regulates acute chromatin dynamics via SWI/SNF association for thermogenesis. *Nature Communications* 7;6:7052

6) Inagaki T.*, Iwasaki S., Matsumura Y., Kawamura T., Tanaka T., Abe Y., Yamasaki A., Tsurutani Y., Yoshida A., Chikaoka Y., Nakamura K., Magoori K., Nakaki R., Osborne T.F., Fukami K., Aburatani H., Kodama T., Sakai J.* (2015). The FBXL10/KDM2B scaffolding protein associates with novel polycomb repressive complex-1 to regulate adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 290(7):4163-77