

## 論文の内容の要旨

論文題目    Epigenome editing by histone demethylase KDM4C in preadipocytes  
(前駆脂肪細胞におけるヒストン脱メチル化酵素 KDM4C による  
エピゲノム編集)

氏名        澤田 知伸

近年世界各国で増加の一途をたどっている肥満症は、2型糖尿病や心血管疾患の罹患率を上昇させることが示されており、その有効な治療法の開発は喫緊の課題と言える。肥満症の病態解明、及び新規治療標的の発見のために、これまでマウス脂肪組織由来である 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いた脂肪細胞分化の研究がさかんに行われてきた。その結果、マスター転写因子として知られている Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) や CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)  $\alpha$  をはじめ脂肪細胞分化に関わる転写因子のカスケードが明らかにされている。

ヒストンの翻訳後修飾や DNA メチル化はエピゲノムとして細胞に記憶され、遺伝子発現や細胞分化を制御する。前駆脂肪細胞においては、ヒストン H3 の 9 番目リジン残基 (H3K9) メチル基転移酵素である SUV39H1 や SETDB1 が PPAR $\gamma$  や C/EBP $\alpha$  の転写抑制に関与すると報告されている (Zhang *et al.*, 2014, Wakabayashi *et al.*, 2009.)。最近の研究で、前駆脂肪細胞の *Pparg*、及び *Cebpa* 遺伝子領域の転写開始点 (transcription start site, TSS) 近傍には、転写促進にはたらくヒストン H3 の 4 番目リジン残基トリメチル化 (H3K4me3) と、転写抑制にはたらくヒストン H3 の 9 番目リジン残基トリメチル化 (H3K9me3) が近接した H3K4/H3K9me3 ビバレントドメインが存在することが明らかにされた (Matsumura *et al.*, 2015.)。前駆脂肪細胞ではこのドメインにより、*Cebpa*、及び *Pparg* の転写は抑制されるが、分化過程では H3K9me3 の脱メチル化に伴い転写が誘導される。前駆脂肪細胞では H3K9 メチル化酵素 SETDB1 により H3K9me3 が維持されるが、分化に伴って H3K9me3 が脱メチル化されるメカニズムはまだ十分に理解されていない。*Cebpa*、及び *Pparg* 遺伝子における H3K9me3 の選択的な脱メチル化は、遺伝子発現、細胞分化、脂肪蓄積の制御につながると期待される。

近年、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術を応用したエピゲノム編集技術の報告がなされてきている。ゲノム編集では、標的遺伝子に相補的な約 20 塩基の配列を有するガイド RNA (gRNA) によって、ヌクレアーゼ活性を有する CRISPR associated protein 9

(Cas9) を標的遺伝子にリクルートし、DNA の二本鎖切断を行う。切断されたゲノムが修復を受ける過程でゲノム配列の編集が行われる。一方、エピゲノム編集では、Cas9 のヌクレアーゼ活性を欠損した変異体である dCas9 にエフェクターとしてエピゲノム修飾酵素を融合させたタンパク質が用いられる。エフェクターを融合させた dCas9 を gRNA により標的遺伝子にリクルートすることで、DNA 切断を起こすことなく局所的にエピゲノムを編集する。これまでに CRISPR-dCas9 を用いて、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による H3K4me2 の脱メチル化、転写共役促進因子 p300 による H3K27 のアセチル化、及びヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 による H3K27 の脱アセチル化のエピゲノム編集が、それぞれマウス ES 細胞、HEK293T 細胞、マウス頭蓋冠由来 MC3T3-e1 細胞で報告されている。しかし、脂肪細胞でのエピゲノム編集、ヒストン H3K9me3 のエピゲノム編集は未だ報告されていない。脂肪細胞におけるエピゲノムの編集技術の確立は、将来的にエピゲノム調節を介した肥満症治療へとつながる可能性がある。

H3K9me3 のエピゲノム編集をする上で、ヒストン H3K9me3 に特異的な脱メチル化酵素である KDM4 (histone lysine demethylase 4) ファミリーに着目した。KDM4 ファミリーは、N 末端側の 350 アミノ酸にヒストン脱メチル化酵素活性をもつ JmjN および JmjC ドメインを有する。KDM4C の発現抑制は細胞全体の H3K9me3 のレベルを増加させ、脂肪細胞分化を抑制すると報告されている (Lu *et al.*, 2012)。この報告は内在性 KDM4C が H3K9me3 の制御を介して、脂肪細胞分化を誘導することを示唆し、KDM4C は H3K9me3 のエピゲノム編集のエフェクターの候補となる。

本研究の目的は、脂肪細胞においてマスター転写因子の一つである *Cebpa* 遺伝子を標的として、ヒストン H3K9 脱メチル化酵素 KDM4C を用いたエピゲノム編集技術を確認することである。

まず、H3K9 脱メチル化酵素 KDM4C と KDM4A に関して、loss-of-function および gain-of-function 実験による機能解析を行った。siRNA を用いた内在性 *Kdm4c* あるいは *Kdm4a* の発現抑制は、*Cebpa* および *Pparg* 遺伝子の発現誘導と脂肪滴の蓄積を抑制した。一方、レトロウイルスによるマウス KDM4C あるいは KDM4A の過剰発現は、*Cebpa* および *Pparg* 遺伝子発現誘導と脂肪滴の蓄積を促進し、*Cebpa* および *Pparg* 転写領域の H3K9me3 レベルを低下させた。これらの結果は KDM4C と KDM4A はともに *Cebpa* および *Pparg* 領域の H3K9me3 の脱メチル化を介して脂肪細胞分化を促進することを示す。

次に *Cebpa* 遺伝子上で H3K9me3 修飾される TSS 下流 1 kb の遺伝子領域に相補的な配列を有する gRNA を 5 種類デザインした。U6 プロモーター下で gRNA を発現する neomycin 耐性のレトロウイルスベクターと、LTR プロモーター下で FLAG タグのついた dCas9 を発現する puromycin 耐性のレトロウイルスベクターを作製した。それぞれの

レトロウイルスを 3T3-L1 細胞に同時感染させ、G418 および puromycin による薬剤選択を行い、gRNA と dCas9 を発現する 3T3-L1 細胞を樹立した。抗 FLAG 抗体を用いた ChIP 解析により、gRNA による dCas9 の *Cebpa* 遺伝子領域へのリクルートを評価した。その結果、5 種のうち 3 種の gRNA で *Cebpa* への dCas9 のリクルートが確認された。*Cebpa* TSS より +892 bp の位置にデザインした gRNA (以下、gRNA-3) が最も標的遺伝子への dCas9 のリクルート効率が高いことが明らかになった。

次に、dCas9 にエフェクターとして KDM4C の酵素活性ドメインを有する N 末端側の 350 アミノ酸を融合させたタンパク質 (dCas9-KDM4C) を発現するレトロウイルスベクターを作製した。レトロウイルス感染と薬剤選択により gRNA-3 と dCas9-KDM4C を発現する 3T3-L1 細胞を樹立した。Empty ウイルスを導入したコントロール細胞、gRNA-3 と dCas9 発現細胞、そして gRNA-3 と dCas9-KDM4C 発現細胞において、H3K9me3 ChIP 解析、及び *Cebpa* 遺伝子発現と脂肪滴の蓄積の評価を行った。dCas9 発現細胞では、コントロール細胞と同様、分化刺激による H3K9me3 のレベルの低下が確認された。一方、dCas9-KDM4C 発現細胞では、分化刺激前からすでに H3K9me3 のレベルは半分以下に低下しており、分化刺激後も H3K9me3 レベルが低く維持された。このことは、gRNA-3 と dCas9-KDM4C により、*Cebpa* 領域の H3K9me3 のエピゲノム編集がなされたことを示す。しかし、dCas9-KDM4C 発現細胞では、コントロール細胞、dCas9 発現細胞に比べて、*Cebpa* 遺伝子の発現誘導、脂肪滴の蓄積が促進されなかった。これらの結果は、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。H3K9 メチル化酵素 SETDB1 のノックダウンでは、H3K9me3 の低下だけではなく、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機構を介して、*Cebpa* の遺伝子発現が制御されることが考えられる。

本研究では、H3K9me3 特異的なヒストン脱メチル化酵素 KDM4C を用いて、前駆脂肪細胞の *Cebpa* 遺伝子領域を標的としてエピゲノム編集を行った。3T3-L1 細胞において gRNA と dCas9 を同時に発現させる系を確立し、dCas9 を *Cebpa* 遺伝子へ高効率にリクルートする gRNA-3 を同定した。gRNA-3 と dCas9-KDM4C の同時発現により、*Cebpa* 遺伝子の H3K9me3 のエピゲノム編集に初めて成功した。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ために役立つと期待される。