

審査の結果の要旨

氏名 澤田 知伸

本研究は、脂肪細胞分化の主要な制御因子である *Cebpa* 遺伝子のエピゲノム制御を明らかにするため、マウス前駆脂肪細胞 (3T3-L1 細胞)における *Cebpa* 転写領域のヒストン H3K9me3 修飾を脱メチル化するエピゲノム編集法の確立を試みた。得られた結果は以下のとおりである。

1. H3K9me3 に特異性の高いヒストン脱メチル化酵素である KDM4A および KDM4C の 3T3-L1 細胞における機能解析を行った。siRNA を用いた内在性 *Kdm4a* あるいは *Kdm4c* の発現抑制は、*Cebpa*, *Pparg* の遺伝子発現誘導と脂肪滴の蓄積を抑制した。レトロウイルスによる KDM4A あるいは KDM4C の発現誘導は、*Cebpa*, *Pparg* の遺伝子発現誘導と脂肪滴の蓄積を亢進し、さらに *Cebpa*, *Pparg* いずれの転写領域においても H3K9me3 のレベルは分化刺激に伴って低下することが示された。
2. CRISPR-Cas9 システムに基づく H3K9me3 のエピゲノム編集を行うために、まず酵素活性を欠損した Cas9 タンパク (dCas9) とガイド RNA (gRNA) をレトロウイルスで 3T3-L1 細胞に co-transduction する系を確立した。*Cebpa* の転写領域において効率よく dCas9 をリクルートする gRNA 3箇所 (*Cebpa* 遺伝子の転写開始点 (TSS) からそれぞれ +892, +1092, +1463 の位置) を同定した。なお、*Cebpa* の TSS +892 の位置にデザインされた gRNA (以下、gRNA-3 と呼ぶ) と最も相同性の高い配列を有する領域で、dCas9 の off-target 効果は認められなかった。
3. dCas9 の C 末端に KDM4C の酵素活性を有する 350 アミノ酸を融合させたタンパク (以下、dCas9-KDM4C と呼ぶ) を発現するレトロウイルスベクターを作製した。dCas9 あるいは dCas9-KDM4C を、gRNA-3 とともにレトロウイルスを用いて 3T3-L1 細胞に co-transduction した。これらの細胞において、dCas9 および dCas9-KDM4C の、タンパク発現レベルと、*Cebpa* 転写領域へのリクルート効率は同程度であることを確認した。dCas9-KDM4C と gRNA-3 を co-transduction した結果、*Cebpa* 転写領域の H3K9me3 が低下することを示した。

以上、本論文はマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 において、ヒストン脱メチル化酵素 KDM4A と KDM4C が、*Cebpa* 転写領域の H3K9me3 の脱メチル化を介して脂肪細胞分化を誘導することを明らかにした。さらに、KDM4C を用いて H3K9me3 の脱メチル化編集法を初めて確立した。本研究は、複雑なエピゲノム制御機構解明への応用が期待されるため、学位の授与に値するものと考えられる。