

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和4年4月20日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 国立大学法人京都大学
職 名 教授
研究代表者 遊佐 宏介

下記のとおり令和3年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:21007)

1. 共同研究課題名	脂肪分化を制御する代謝エピゲノム因子の gRNA スクリーニング			
2. 共同研究目的	脂肪細胞分化は、 <i>Cebpa</i> や <i>Pparg</i> などのマスター転写因子により制御されるが、最近エピゲノムの関与が注目を集めている。しかしながら、多様な性質を持つ脂肪細胞の分化を制御するエピゲノム機構については未解明な点が多い。群馬大学生体調節研究所の稲垣らのグループは、これまで脂肪細胞分化関連遺伝子の発現がエピゲノム因子によって制御されることを示してきた専門家であり、我々が立ち上げた gRNA スクリーニングシステムを利用して共同研究を実施することで、エピゲノム制御因子を同定することを目指す。			
3. 共同研究期間	令和3年 4月 1日 ~ 令和4年 3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 遊佐 宏介	京都大学 ウイルス再生医学研究所 幹細胞遺伝学分野	教授	研究の総括 RNA スクリーニングに係る 実験・解析	
(分担研究者)				
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	代謝エピジェネティクス分野	氏 名	稲垣 毅

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

稲垣らと共同して、脂肪滴の蛍光染色を指標とした分化度を基準とする脂肪細胞分化制御因子のスクリーニングを実施する。我々がもつ gRNA 発現レンチウイルスライブラリーを、稲垣らが構築した Cas9 強制発現脂肪前駆細胞に感染させ、Puromycin による薬剤選択を行った後、インスリン、デキサメサゾン、IBMX を含む分化誘導培地を用いて脂肪細胞分化を誘導する。培養ディッシュから分化細胞を回収したうえで蛍光染色を実施し、フローサイトメーターにかける。蛍光程度と側方散乱光を指標として細胞分化度による細胞群の分離を行い、それぞれの細胞群からゲノムを抽出して次世代シーケンス解析に付す。得られた結果は、gRNA のエンリッチメント解析により各細胞群に特異的に認められる gRNA を絞り込むことで、脂肪細胞分化関連因子の候補因子を同定する。候補因子については、個々の遺伝子の gRNA レトロウイルスを作製して脂肪細胞分化への影響を検証する。なお、gRNA スクリーニングの実施にあたり、細胞一個に感染するレンチウイルス数が約 1 になると考えられる条件 (30%程度) を検討するための基礎実験等が必要となる。

脂肪滴の蛍光染色を指標とするスクリーニングと並行して、より高感度かつ分化早期におけるスクリーニングを確立するため、aP2 プロモーター活性に基づく分化度スクリーニング法構築の可能性の検討を、稲垣らと共同で開始する。そのため、我々が立ち上げた PiggyBac システムを利用して、aP2 プロモーター下に GFP レポーターを発現する Cas9 強制発現脂肪前駆細胞の樹立を目指す。

7. 共同研究の成果

gRNA 発現レンチウイルスライブラリーを用いた脂肪細胞分化制御因子のスクリーニングを実施した。スクリーニングにおいては、脂肪細胞の分化度を評価する指標として脂肪滴の蓄積の程度を利用することとし、LipidTOX による脂肪滴の染色を行った。はじめに、gRNA スクリーニングの基礎検討を実施するため、脂肪細胞分化のマスター制御因子である *Pparg* 遺伝子を標的とする gRNA 発現レトロウイルスを作製した。このウイルスを Cas9 強制発現脂肪前駆細胞に感染させて gRNA を強制発現させ、抗生物質スクリーニングを実施したのち脂肪細胞分化を誘導した。分化誘導後 8 日目に LipidTOX 染色を実施したところ、コントロール細胞と比較して脂肪蓄積が減少していることが確認された。次に、gRNA 発現レンチウイルスライブラリーを用いたスクリーニングを実施することとし、上記と同様のプロトコルを経て LipidTOX 染色を実施した。その後、セルソーターを用いて LipidTOX 染色程度の上位 5% (分化細胞群) および下位 5% (非分化細胞群) を選別し、さらにソート前の細胞群を加えた 3 群からゲノム DNA を回収した。gRNA 配列を PCR によって増幅した後、次世代シーケンサーにかけ、リード配列に対するエンリッチメント解析を行った。その結果、脂肪細胞分化制御候補因子が得られたが、個別解析を実施した結果、多くは既知の因子にとどまった。そのため、脂肪細胞分化過程の早い段階における制御因子を高感度に検討するための新規スクリーニング細胞の樹立に挑戦した。PiggyBac システムを用いて、aP2 プロモーターの下流に GFP レポーターを組み込んだ配列を Cas9 強制発現脂肪前駆細胞に導入し、抗生物質スクリーニングを実施し、新規細胞株導入株を樹立した。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換 (本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

Suzuki T, Hayashi M, Komatsu T, Tanioka A, Nagasawa M, Tanimura-Inagaki K, Rahman MS, Masuda S, **Yusa K**, Sakai J, Shibata H, **Inagaki T**. Measurement of the nuclear concentration of α -ketoglutarate during adipocyte differentiation by using a fluorescence resonance energy transfer-based biosensor with nuclear localization signals. *Endocr J*. 2021 Dec 28;68(12):1429-1438. doi: 10.1507/endocrj.EJ21-0255. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34261826.

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

該当なし

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

該当なし

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

1. gRNA スクリーニングのエンリッチメント解析結果の説明・共有 (申請代表者から稲垣教授)
2. 候補因子の脂肪細胞分化に対する影響の解析結果の説明・共有 (稲垣教授から申請代表者)
3. 新規スクリーニング細胞株の樹立に関する情報・共有