

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16192

研究課題名（和文）クロマチン3次元構造解析による脂肪細胞特異的な遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of adipocyte-specific transcriptional regulation by analyzing three-dimensional chromatin interactions through Promoter Capture Hi-C method

研究代表者

青山 倫久（AOYAMA, TOMOHISA）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50645538

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪細胞分化において重要な役割を果たすPPAR によるC/EBP 遺伝子の転写制御機構は不明であった。本研究ではクロマチン3次元構造の視点からゲノムワイドにバイアスなく脂肪細胞特異的な遺伝子発現制御機構を解明する目的で、3C法と次世代シーケンサーの組み合わせによるPromoter Capture Hi-C法によりプロモーター・エンハンサー間の近接関係の網羅的な解析を行い、3C法で見出していたC/EBP 遺伝子のプロモーターと下流の遠位領域との間の近接関係が確認されたことに加えて、新たなゲノム領域との間に近接関係が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーを用いた転写因子の結合領域やヒストン修飾領域のゲノムワイドな解析から、遺伝子発現の制御領域（エンハンサー）が遠位領域などゲノム上に広範囲に分布ことが明らかとなってきた。遠位エンハンサーは標的遺伝子のプロモーターとの間にクロマチンループを形成し、3次元空間上で近接して直接に相互作用することで発現制御を行うと考えられている。本研究はクロマチン3次元構造といった新しい視点からゲノムワイドにバイアスなく脂肪細胞特異的な遺伝子発現制御機構を解明する試みであり、新たな知見が得られることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Adipogenesis is controlled by a cascade of transcription factors. Although the positive feedback loop established by the master regulators PPAR and C/EBP is considered to be crucial, the precise mechanism by which PPAR regulates C/EBP remains elusive. In this study, we analyzed unbiased genome-wide promoter-enhancer interactions in adipocytes by using Promoter Capture Hi-C which is a combination of the 3C method and high-throughput sequencing. In addition to the interaction between the C/EBP promoter and the downstream distal region that we previously demonstrated in the 3C method, we identified novel interactions among the promoter and previously unrecognized genomic regions in the C/EBP locus.

研究分野：代謝および内分泌学関連

キーワード：脂肪細胞 転写制御 遠位エンハンサー クロマチン3次元構造解析

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq による転写因子の結合領域やヒストン修飾領域のゲノムワイドな解析から、遺伝子発現の制御領域(エンハンサー)がプロモーターの近位領域以外にもゲノム上に広範囲に分布し、「遠位」エンハンサーの重要性が明らかになりつつある。離れた転写制御領域による遺伝子発現制御の機構としては、遠位エンハンサーとプロモーターがクロマチンループを形成することで、3次元空間上で近接して直接に相互作用する「ルーピングモデル」が、有力なメカニズムとして提唱されており(*Nat Genet* 2002;**32**, 555-6)、このようなクロマチンの3次元構造解析の手法として Dekker 等は Chromosome Conformation Capture (3C) 法を報告している(*Science* 2002; **295**, 1306-11)。

脂肪細胞の分化は転写因子のカスケードにより調節され、中でもマスターレギュレーターである PPAR γ と C/EBP α のポジティブフィードバックループが重要な役割を果たすと考えられているが (*Mol Cell* 1999;**3**, 151-8)、PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御機構は現在まで不明であった。我々は東大先端科学技術研究センターの油谷・酒井研究室との共同研究で、3T3-L1 脂肪細胞において ChIP-seq による PPAR γ 結合部位のゲノムワイド解析を行い、既存のアプローチでは明らかでなかった C/EBP α 遺伝子下流の遠位領域に PPAR γ 結合部位のクラスター (+3, +19, +22, +24, +50, +53kb) を同定した。Young 等はマスターレギュレーターが Cell identity を規定する重要な遺伝子の近くにスーパーエンハンサーと呼ばれるエンハンサーのクラスターを形成し、スーパーエンハンサーにはエンハンサーとプロモーター間を架橋するメディアーター複合体が高度に集積することを報告しているが (*Nat Genet.* 2015 Jan;**47**(1):8-12)、実際に C/EBP α 遺伝子下流の遠位エンハンサー領域には MED1 サブユニットの高度な集積を認め、スーパーエンハンサーを形成していた。さらに遠位エンハンサー領域とプロモーター領域に、ゲノム DNA のループ形成に関わるインスレーター蛋白 CTCF (*Nat Genet* 2011;**43**, 630-8.) の結合部位を認めた。3C 法による解析では、C/EBP α 遺伝子の遠位エンハンサー・プロモーター間に分化により増強する近接関係を認め、PPAR γ や CTCF のノックダウンでは、同領域間の近接関係が減弱し、C/EBP α 遺伝子発現低下、脂肪細胞分化の抑制を認めることから、PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御において、CTCF を介したスーパーエンハンサーを有するクロマチンループの形成が重要である可能性が示唆された。

さらに我々は脂肪細胞における ChIP-seq による MED1 結合領域のゲノムワイドな解析から、C/EBP α 遺伝子下流の遠位領域以外にもゲノム全体の中で約 540 ヶ所のスーパーエンハンサーが形成される新たなゲノム領域を同定した。しかしながらこれらの標的遺伝子やゲノムワイドレベルでの脂肪細胞特異的な遺伝子発現制御に果たす役割は不明であった。近年、3C 法と次世代シーケンサーを組み合わせにより「1」領域 対「多」領域のクロマチン相互作用を解析する 4C (Circularized Chromosome Conformation Capture)-seq や、「多」領域 対「多」領域のクロマチン相互作用を網羅的に解析する Hi-C 法が開発され、ゲノムワイドなクロマチンの近接関係の解析が可能となった (*Nat Rev Genet.* 2013;**14**(6):390-403)。さらに最近、Hi-C ライブラリーの中からプロモーター領域を含むもののみを RNA プローブにより抽出することで解像度を上げた Promoter Capture Hi-C が開発され、ゲノムワイドなプロモーター・エンハンサー間のクロマチン相互作用の解析が初めて可能となった(*Nat Genet.* 2015 Jun;**47**(6):598-606)。

2. 研究の目的

本研究ではクロマチン 3次元構造の視点からゲノムワイドにバイアスなく脂肪細胞特異的な遺伝子発現制御機構を解明する目的で、近年 3C 法と次世代シーケンサーの組み合わせによりプロモーター・エンハンサー間の近接関係の網羅的な解析が可能となった Promoter Capture Hi-C 法を駆使して、白色脂肪分化特異的クロマチン相互作用による遺伝子発現機構や、白色脂肪と褐色脂肪、白色脂肪より誘導されるベージュ脂肪の比較検討による細胞種特異的なクロマチン相互作用による遺伝子発現機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

現在までに東大先端科学技術センターとの共同研究による予備的検討で、脂肪細胞において「多」領域 対「多」領域のクロマチンの近接関係の網羅的に解析可能な Hi-C 法による解析を行い、良好なシグナルが得られていた。今回さらに、脂肪細胞において Hi-C ライブラリーの中からプロモーター領域を含むもののみを RNA プローブにより抽出することで解像度を上げた Promoter Capture Hi-C 法を行うことで、プロモーター・エンハンサー間の近接関係の網羅的な解析を試みた。

4 . 研究成果

東大先端科学技術センターとの共同研究により脂肪細胞において Promoter Capture Hi-C 法によるプロモーター・エンハンサー間の近接関係の網羅的な解析を行った。C/EBP α 遺伝子領域においては、3C 法で見出していた C/EBP α 遺伝子のプロモーターと下流の遠位領域との間の近接関係が確認されたことに加えて、新たなゲノム領域との間に近接関係が存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青山倫久、脇裕典、井上剛、岡部篤史、堤修一、中村正裕、于静、平池勇雄、和田洋一郎、酒井寿郎、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝
2. 発表標題 脂肪細胞におけるスーパーエンハンサーループの形成を介したPPAR によるC/EBP 遺伝子の転写制御
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青山倫久、脇裕典、井上剛、岡部篤史、堤修一、中村正裕、于静、平池勇雄、和田洋一郎、酒井寿郎、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝
2. 発表標題 脂肪細胞でのスーパーエンハンサーループの形成を介したPPAR によるC/EBP 遺伝子の転写制御
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青山倫久、脇裕典、山内敏正
2. 発表標題 (シンポジウム15 薬物療法) 代謝促進薬・吸収阻害薬の可能性
3. 学会等名 第40日本肥満学会・第37回日本肥満症治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----