

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560395

研究課題名(和文) enChIPによる遺伝子座特異的ヒストン修飾酵素複合体とエネルギー代謝機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of locus specific chromatin complex formation and energy expenditure gene expressions using enChIP

研究代表者

酒井 寿郎 (SAKAI, Juro)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：80323020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、CRISPR-CAS9システムによるゲノム編集技術、これを応用したengineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法が開発され、特異的な遺伝子座に結合する核酸やタンパク質の解析が可能となりつつある。本研究ではこれらの技術を用いて実際に、 $\beta$ 1アドレナリン受容体遺伝子Adrb1の遠隔エンハンサーを欠失させ、アドレナリン刺激依存的な転写誘導が見られなくなることで、そして、このメカニズムとしてクロマチンの高次構造変化が損なわれることを示した。

研究成果の概要(英文)：CRISPR-CAS9 system is a recently developed gene editing method and its applied method, namely, engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) is beneficial to identify specific nucleotides or proteins that specifically interact to the specific gene loci. In the current study, using these methods, we showed that distal enhancer of  $\beta$ 1 adrenergic receptor gene Adrb1, whose transcription is induced upon adrenergic stimulation and whose gene product is important in the activation of brown fat, interacts with Adrb1 promoter via long-range chromatin looping: deletion of E1 enhancer blunted  $\beta$ -AR induced gene transcription and higher order chromatin structure changes.

研究分野：転写因子、シグナル、エピゲノム、ゲノム編集

キーワード：生活習慣病 エピゲノム ヒストン修飾酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、核内の DNA やヒストンへのメチル化などの化学修飾や、**クロマチンの高次構造**を動的に変化させることで遺伝子の発現を制御するという後天的な遺伝子発現制御機構(エピゲノム)が明らかにされつつある。生活習慣や環境因子はエピゲノムとして記憶されるため、多因子疾患である生活習慣病発症に重要な役割を担う(引用文献1,2)。

(2) 遺伝子の遠距離にあるエンハンサーが、細胞の系譜の決定や発現制御に重要なタンパク質複合体が局在し、細胞の特異性を決定する重要な役割をすることが明らかにされつつある。クロマチンが3次元的にループ構造をとって遠隔のエンハンサーがプロモーター領域に近接して転写を制御する(引用文献3)。

(3) 褐色脂肪細胞株において1 アドレナリン受容体 (*Adrb1*) が褐色脂肪細胞の機能に重要である(図1)。発現制御に2つの遠隔のエンハンサー(E1とE2)が重要であることを見出したが、環境からの刺激でどう応答するかは不明である。

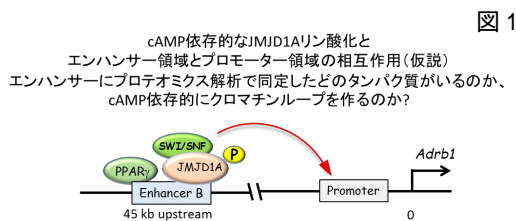


図1

(3) 近年 CRISPR システムを応用した engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法が開発され(図2、(引用文献4)、特異的な遺伝子座に結合するDNAを解析することが可能となりつつある。この原型となるCRISPR-Cas9 システムは特定の遺伝子領域を欠失させることを可能としたゲノム編集のあらたな解析手法である。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 褐色脂肪細胞株において

1 アドレナリン受容体 (*Adrb1*) で発見した2つの遠隔のエンハンサーがアドレナリン刺激に伴い、クロマチン高次構造の変化を介して *Adrb1* 発現を制御するかを解析する。このために、遠隔エンハンサーE1 (45kb 上流) と E2 (23kb 上流) とプロモーター領域との近接関係を enChIP で解析する。

(2) そして、この遠隔エンハンサーE1 をゲノム編

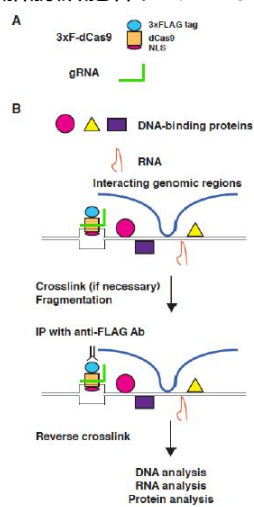


図2 BBRC 2013 Fujita T et al

集で欠失させたときの遺伝子発現の反応を解析し、仮説を検証する。

3. 研究の方法

(1) enChIP 用 CRISPR 系を褐色脂肪細胞において樹立する。

(2) これを用いて アドレナリン刺激にともなう *Adrb1* 遺伝子プロモーター領域と相互作用しているゲノム領域を検出する。

(3) 相互作用している領域を CRISPR-Cas9 システムで欠損させ、遠隔エンハンサーの必要性の proof of concept をする。褐色脂肪細胞のシングルセルクローニングをする。

欠失させるエンハンサーE1 を挟み込むようにガイド RNA を作製し、Cas9 と FLAG タグを融合させた発現ベクターを作製する。これをトランスフェクションし、クローニングを行い、ゲノミック PCR によって目的の遺伝子領域が欠失しているクローンを選別する。*Adrb1* の発現量を解析し、欠失した細胞におけるクロマチン近接関係の変化を 3C で解析する。

4. 研究成果

(1) enChIP の確立とエンハンサープロモーター近接関係の解析。特定の領域にガイド RNA を作製し、この領域でのタグ抗体を使ったクロマチン免疫沈降 (ChIP) ができることを確認した。しかしながら脂肪細胞を分化させると ChIP 効率が思うように上がらず、この方法での解析手法は断念し、3C (Chromatin conformation Capture) を樹立した。

3C 解析の結果、褐色脂肪細胞株でアドレナリン刺激を加えると E1 とプロモーターが近接することが明らかとなった。一方 E2 とプロモーターは刺激とはあまり関係なく近接している知見が得られた (Nat Commun 2015)。

(2) ついでこの近接関係が本当に *Adrb1* の遺伝子発現制御に関与しているか、

CRISPR-Cas9 法によりエンハンサーE1 を欠失させ、これによってアドレナリン刺激による発現が変わるかを解析した。まず2つのガイド RNA をそれぞれ5'側、3'側でE1 を挟む形で設計し、CAS9 とこのガイド RNA を、細胞にトランスフェクションし、シングルセルクローニングを行った(図3)。

ダイレクシーケンスにより設計したガイ

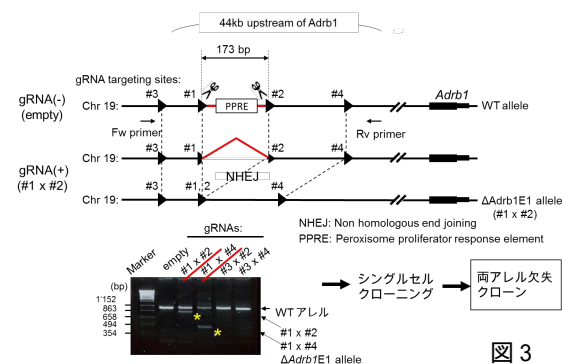


図3

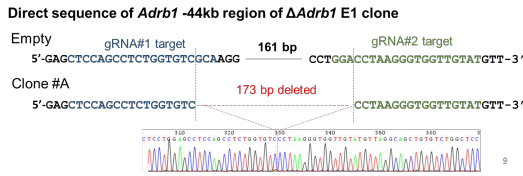


図 4

ド RNA 標的配列に挟まれた領域が欠失した細胞を見出した(図 4)。この欠失した細胞クローン 4 つを無作為に選びコントロールとともに、褐色脂肪細胞へと分化誘導を行った後、アドレナリン受容体アゴニストである isoproterenol (ISO) で刺激し、*Adrb1* の発現量変化を解析した。ISO 刺激を加えると、control clone はそれぞれ *Adrb1* の mRNA が 2 倍の上昇を示したが、E1 欠失クローン統計学的優位な上昇が認められなかった。

さらに E1 欠失クローンにおいて E1 と *Adrb1* プロモーターとの近接作用が失われた結果、*Adrb1* 発現が減少し

たという仮説を検証するため 3C 法により解析した。先行研究同様に ISO 処理による E1 (-43 kb) 領域と *Adrb1* プロモーターとの近接関係の有意な上昇が見られるが、E1 欠失クローンにおいては近接関係の有意な上昇が認められなかった(図 6 左)。

E2 (-26 kb) 領域は定常的に *Adrb1* プロモーターと近接関係にあるが、この領域においてはコントロールクローン、E1 欠失クローンともに ISO 処理による近接関係の変化は認められなかった(図 5、図 6 右)。

以上の結果から、*Adrb1E1* は アドレナリン受容体刺激依存的な *Adrb1E1* 周辺領域と *Adrb1* プロモーターとの近接関係を制御していることが示唆された。

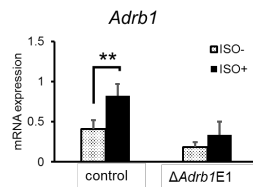


図 5

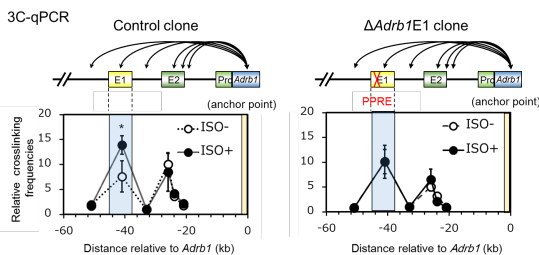


図 6

#### < 引用文献 >

1. Wakabayashi K, Sakai J et al, The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. **Mol Cell Biol** 29, 3544-3555 (2009).
2. Inagaki T, Sakai J et al., Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice. **Genes Cells** 14,

991-1001 (2009).

3. Junwei Shi, Warren A. Whyte, Cinthya J. Zepeda-Mendoza, et al..Role of SWI/SNF in acute leukemia maintenance and enhancer-mediated Myc regulation. **Genes & Development** 27 2648-62, 2013
4. Fujita T1, Fujii H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. **Biochem Biophys Res Commun.** 439, 132-136, 2013

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 9 件)\*は責任著者

1. Inagaki T, Sakai J, Kajimura S. (2016) Transcriptional and epigenetic control of brown/beige adipocyte development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 査読有, Jun 2. doi: 10.1038/nrm.2016.62. [Epub ahead of print].
2. Ohguchi H, Hideshima T, Bhasin MK, Gorgun GT, Santo L, Cea M, Mimura N, Suzuki R, Tai Y-T, Carrasco RD, Raje N, Richardson PG, Harigae H, Sanda T, Sakai J, Anderson KC. (2016) The KDM3A-KLF2-IRF4 axis maintains myeloma cell survival. **Nature Commun**, 査読有, 7, 10258, doi: 10.1038/ncomms10258
3. Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, Yoshida A, Kano Y, Kimura H, Tanaka T, Tsutsumi S, Nakao M, Doi T, Fukami K, Osborne TF, Kodama T, Aburatani H, Sakai J.\* (2015) H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-specific DNA Methylation Pauses Adipocyte Differentiation. **Molecular Cell**, 査読有, 60, 584-596, doi:10.1016/j.molcel.2015.10.025
4. 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 TF, 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 Commun**, 査読有, 6, 7052, doi: 10.1038/ncomms8052
5. 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

- TF, 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*, 査読有, 290, 4163-4177, doi: 10.1074/jbc.M114.626929
6. Tachibana K, Gotoh E, Kawamata N, Ishimoto K, Uchihara Y, Iwanari H, Sugiyama A, Kawamura T, Mochizuki Y, Tanaka T, Sakai J, Hamakubo T, Kodama T, Doi T. (2015) Analysis of the subcellular localization of the human histone methyltransferase SETDB1. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 465, 725-731, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.065
  7. Raza-Iqbal S, Tanaka T, Anai M, Inagaki T, Matsumura Y, Ikeda K, Taguchi A, Gonzalez FJ, Sakai J, Kodama T. (2015) Transcriptome Analysis of K-877 (a Novel Selective PPARalpha Modulator (SPPARMalpha))-Regulated Genes in Primary Human Hepatocytes and the Mouse Liver. *J Atheroscler Thromb*, 査読有, 22, 754-772, doi: 10.5551/jat.28720
  8. Tanaka T, Tahara-Hanaoka S, Nabekura T, Ikeda K, Jiang S, Tsutsumi S, Inagaki T, Magoori K, Higurashi T, Takahashi H, Tachibana K, Tsurutani Y, Raza S, Anai M, Minami T, Wada Y, Yokote K, Doi T, Hamakubo T, Johan A, J. GF, Nakajima A, Aburatani H, Naito M, Shibuya A, Kodama T, Sakai J.\* (2014) PPAR beta/delta activation of CD300a controls intestinal immunity. *Scientific Reports*, 査読有, 4, 5412, doi: 10.1038/srep05412
  9. Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Sakai J (41人中31番目), Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ihara S, Endo A, Kodama T, Wada Y. (2014) Direct Evidence for Pitavastatin Induced Chromatin Structure Change in the KLF4 Gene in Endothelial Cells. *PLoS One*, 査読有, 9, e96005, doi: 10.1371/journal.pone.0096005
- [学会発表] (計 35 件)
1. Yoshihiro Matsumura, Ryo Nakaki, Takeshi Inagaki, Ayano Yoshida, Yuka Kano, Hiroshi Kimura, Toshiya Tanaka, Shuichi Tsutsumi, Mitsuyoshi Nakao, Takefumi Doi, Kiyoko Fukami, Timothy F. Osborne, Tatsuhiko Kodama, Hiroyuki Aburatani, and Juro Sakai : H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-Specific DNA Methylation Pauses Adipogenesis. The Keystone Symposia -Chromatin and Epigenetics-, Workshop 4, Whistler (Canada), March 20-24 2016
  2. 酒井寿郎, Eko F. Ariyant, 曾我朋義, 稲垣毅, 松村欣宏 : Metabolic regulation of Adipocyte differentiation by isocitrate dehydrogenase and Jmjc histone, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (神戸), 2015 年 12 月 3 日
  3. 松村欣宏, 吉田文乃, 仲木竜, 鹿野優佳, 稲垣毅, 油谷浩幸, 酒井寿郎 : 細胞系譜特異的 DNA メチル化により形成される H3K4/H3K9me3 クロマチドメインは脂肪細胞分化を停止させる. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (神戸), 2015 年 12 月 3 日
  4. Takeshi Inagaki, Yohei Abe, Royhan Rozqie, Yoshihiro Matsumura, Shingo Kajimura, Juro Sakai Regulation of Higher-order Chromatin Structure during Thermogenesis in Brown Adipocytes The 46th NIPS International Symposium, Nagoya Congress Center (Nagoya), October 3, 2015
  5. Sakai J.:  $\beta$ -Adrenergic induced phosphorylation of JMJD1A drives energy expenditure via SWI/SNF chromatin remodeler in Brown Adipocytes, The 47th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society, Sendai International Center (Sendai), July 10, 2015
  6. 稲垣毅, 阿部陽平, Rozqie Royhan, 松村欣宏, 梶村真吾, 児玉龍彦, 油谷浩幸, 酒井寿郎 : アディポバイオリロジーを制御するヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A の修飾シグナル, 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 海峡メッセ下関 (下関), 2015 年 5 月 22 日
  7. 酒井寿郎 : 核内受容体 PPAR $\gamma$  とシグナル感知脱メチル化酵素によるエネルギー代謝制御機構. 第 88 回内分泌学会総会, ホテルニューオータニ東京 (東京), 2015 年 4 月 25 日
  8. 稲垣毅, 阿部陽平, Rozqie Royhan, 松村欣宏, 川村猛, 仲木竜, 鶴谷悠也, 谷村恭子, 田中十志也, 児玉龍彦, 油谷浩幸, 酒井寿郎 : 脂肪細胞における新規エピゲノム制御機構. 第 52 回日本臨床分子医学会学術集会, みやこめっせ (京都), 2015 年 4 月 11 日
  9. Juro Sakai, Yoshihiro Matsumura, Ariyanto Fuji Eko, Takeshi Inagaki: A Role of Isocitrate Dehydrogenase 3 in Regulation of Epigenome and Transcription during Adipogenesis. 12th Asian Congress of Nutrition, PACIFICO Yokohama (Yokohama), May 16, 2015

10. Sakai, J.: PKA-dependent Association of Histone Demethylase JMJD1A with SWI/SNF and PPAR $\gamma$  Alters Chromatin Dynamics and Thermogenesis in Brown Adipocytes, The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, PACIFICO Yokohama (Yokohama), November 26, 2014
11. 酒井寿郎: PKA-dependent phosphorylation of JMJD1A drives energy expenditure through higher-order chromatin regulation via SWI/SNF and PPAR $\gamma$  association in brown adipocytes. 第 87 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都), 2014 年 10 月 18 日
12. Inagaki, T., Abe, Y., Rozqie, R., Kawamura, T., Tsurutani, T., Tanimura, T., Matsumura, Y., Sakai, J.: JMJD1A Regulates Metabolic Gene Expression by Mediating Long-Range Genomic Interactions in Response to  $\beta$ -Adrenergic Stimulation, The 46th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society, Keio Plaza Hotel (Tokyo), July 11, 2014
13. Juro Sakai: Metabolic and environmental regulations of JmjdC histone demethylases, The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan, Workpia Yokohama (Yokohama), June 27, 2014
14. 酒井寿郎: 交感神経刺激による脂肪燃焼と肥満におけるエピゲノム変化の役割. 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 福岡国際会議場・福岡サンパレス (福岡), 2014 年 4 月 24 日
15. Juro Sakai: PKA-dependent phosphorylation of JMJD1A drives energy expenditure through Higher-Order Chromatin Regulation via SWI/SNF and PPAR $\gamma$  Association in Brown Adipocytes. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting, Miyakomesse (Kyoto), April 15, 2014

〔図書〕(計 1 件)

1. 酒井寿郎: 第 2 章 糖尿病とエピゲノム. エピジェネティクスの産業応用 (畑田出穂・久保田健夫 監修), 198 - 209, シーエムシー出版, 2014

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年月日 :  
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

〔その他〕  
 ホームページ等  
<http://www.mm.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 寿郎 (SAKAI, Juro)  
 東京大学・先端科学技術研究センター・  
 教授  
 研究者番号 : 80323020

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki)  
 東京大学・先端科学技術研究センター・  
 教授  
 研究者番号 : 10202657

川村 猛 (KAWAMURA, Takeshi)  
 東京大学・アイソトープ総合センター  
 准教授  
 研究者番号 : 70306835

稲垣 毅 (INAGAKI, Takeshi)  
 東京大学・先端科学技術研究センター・  
 特任准教授  
 研究者番号 : 10507825

松村 欣宏 (MATSUMURA, Yoshihiro)  
 東京大学・先端科学技術研究センター・  
 助教  
 研究者番号 : 20375257

藤井 穂高 (FUJII, Hotaka)  
 大阪大学・微生物研究所・准教授  
 研究者番号 : 30302665