

平成30年6月8日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09378

研究課題名(和文) 高次クロマチン構造解析・ゲノム編集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) Formation of a Super-enhancer Loop Contributes to Transactivation of Cebpa Expression by PPAR γ during Adipocyte Differentiation

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) 3,800,000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。ChIP-seq解析により、C/EBP遺伝子の遠位領域にPPAR結合部位のクラスターを同定し、これらの領域は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とプロモーターにゲノムのループ構造の形成に関わるCTCFの結合部位を見出した。4C-seqや3C法では、遠位エンハンサーとプロモーター間に分化により増強する近接関係を認めた。PPARによるC/EBP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。

研究成果の概要(英文)：Adipogenesis is controlled by a cascade of transcription factors. The positive feedback loop established by the master regulators PPAR and C/EBP is considered to be crucial. Here, we performed ChIP-seq and identified a cluster of multiple distal PPAR binding sites (+3, +19, +22, +24, +50, +53kb) in downstream region of the Cebpa gene in differentiated 3T3-L1 adipocytes. These clusters of enhancers showed high enrichment of Mediator complex binding and formed a super-enhancer. Furthermore, CTCF - a multifunctional insulator protein which mediates long-range chromatin looping - bound to both distal enhancers and the promoter. 4C-seq and 3C assays demonstrated formation of a chromatin loop encompassing the Cebpa promoter and the distal super-enhancer. Our findings suggest that PPAR super-enhancer and CTCF-mediated loop formation are important for transactivation of Cebpa gene expression and differentiation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 肥満 脂肪細胞 遺伝子 転写制御 高次クロマチン構造 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞分化は転写因子のカスケードにより制御され、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が、PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御機構は不明であった。

近年、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されつつある。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、この様なクロマチンの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。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq や、核内でのゲノム領域間の3次元的な近接関係を検出する 3C 法を駆使して、脂肪細胞分化において現在まで明らかでなかった PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御メカニズムの解明を試みる。

3. 研究の方法

3T3-L1 脂肪細胞分化前後における、転写因子、メディエーター複合体のゲノムワイドな結合領域を ChIP-seq、核内ゲノムの1対1領域間の近接関係を 3C 法、1対多領域間の近接関係を 3C 法と次世代シーケンサーを組み合わせた 4C (circular chromosome conformation capture)-seq、遠位エンハンサー欠損細胞株の作製を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により試みた。

4. 研究成果

これまでの申請者等の検討で、3T3-L1 脂肪細胞における ChIP-seq によるゲノムワイド解析から、C/EBP α 遺伝子下流の遠位領域 (+ 3, + 19, + 22, + 24, + 50, + 53kb) に PPAR γ 結合部位のクラスターを同定した。さらに C/EBP α 遺伝子の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結白 CTCF の結合部位を見出した。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エーター複合体が高度に集積することを報告している (Nat Genet. 2015 Jan;47(1):8-12)。

実際に 3T3-L1 脂肪細胞における ChIP-seq による解析から、C/EBP α 遺伝子下流の遠位エンハンサー領域にはメディエーター複合体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。ゲノム領域間の3次元的な近接関係を検出する 3C 法と次世代シーケンサーの組み合わせによりゲノムワイドにクロマチン相互作用を検出可能な 4C-seq による解析では C/EBP α 遺伝子のプロモーターや下流の遠位領域に分化により増強するシグナルを認め、さらに 3C 法による解析では遠位エンハンサーとプロモーター間に分化により増強する近接関係を認めた。PPAR γ や CTCF のノックダウンでは同領域間の相互作用が減弱し、C/EBP α 遺伝子の発現および脂肪細胞分化が抑制された。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。今後さらにゲノム編集技術による遠位エンハンサー欠損細胞株の解析などにより、これらの領域が C/EBP α 遺伝子の発現制御や脂肪細胞分化に果たす役割の検討が重要と考えられる。

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0件)

[学会発表](計18件)

- 1) 第38回日本肥満学会(2017年10月)(口演発表)
青山倫久、脇裕典、井上剛、岡部篤史、堤修一、若林賢一、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:「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 γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御」
- 2) 第60回日本糖尿病学会年次学術集会(2017年5月)(ポスター発表)
青山倫久、脇裕典、井上剛、岡部篤史、堤修一、若林賢一、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:「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 γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御」
- 3) 第90回日本内分泌学会学術総会(2017年4月)(口演発表)
青山倫久、脇裕典、井上剛、岡部篤史、堤修一、若林賢一、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:「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 γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御」
- 4) 第28回分子糖尿病学シンポジウム

- (2016年12月)(口演発表)(Research Travel Grant)
- 青山倫久、脇裕典、井上剛、岡部篤史、堤修一、若林賢一、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：「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 γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御」
- 5) 第37回日本肥満学会(2016年10月)(口演発表)
青山倫久、脇裕典、井上剛、岡部篤史、堤修一、若林賢一、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：「高次クロマチン構造解析による脂肪細胞におけるPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」
 - 6) 第21回アディポサイエンス・シンポジウム(2016年8月)(招待口演)
青山倫久、脇裕典、井上剛、岡部篤史、堤修一、若林賢一、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：(セッション2『細胞機能制御のメカニズム』)「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 γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御」
 - 7) 第15回生体機能研究会(2016年7月)(口演発表)
青山倫久、脇裕典、若林賢一、井上剛、中村正裕、岡部篤史、堤修一、于静、藤田隆教、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、植木浩二郎、和田洋一郎、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝：「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」
 - 8) American Diabetes Association 76th Scientific Sessions (New Orleans, USA, 2016.6) (oral presentation)
Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Youichiro Wada, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, Toshimasa Yamauchi and Takashi Kadowaki: Formation of a Super-Enhancer Loop Contributes to Transactivation of Cebpa Expression by PPAR γ during Adipocyte Differentiation
 - 9) 第59回日本糖尿病学会年次学術集会(2016年5月)(口演発表)
青山倫久、脇裕典、若林賢一、井上剛、岡部篤史、堤修一、中村正裕、藤田隆教、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、植木浩二郎、和田洋一郎、酒井寿郎、児玉龍彦、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝：「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」
 - 10) 第89回日本内分泌学会学術総会(2016年4月)(口演発表)
青山倫久、脇裕典、若林賢一、井上剛、岡部篤史、堤修一、中村正裕、藤田隆教、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、植木浩二郎、和田洋一郎、酒井寿郎、児玉龍彦、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝：「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」
 - 11) Keystone Symposia Conference — Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies (Kyoto, Japan, 2015.10) (Keystone Symposia Scholarship)
Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Takanori Fujita, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Takuya Sugiyama, Ueki Kohjiro, Youichiro Wada, Shuichi Tsutsumi, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani and Takashi Kadowaki: Long-Range Transactivation of Cebpa Expression by PPAR γ through Distal Enhancers during Adipocyte Differentiation
 - 12) The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity (AOCO2015) (Nagoya, Japan, 2015.10)
Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Takanori Fujita, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Takuya Sugiyama, Ueki Kohjiro, Youichiro Wada, Shuichi Tsutsumi, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani and Takashi Kadowaki: Long-Range Transactivation of C/EBP α Gene Expression by PPAR γ through Distal Enhancers during Adipocyte Differentiation.
 - 13) 第36回日本肥満学会(2015年10月)
青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、富岡恵、藤田隆教、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝：「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介したPPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」
 - 14) 第20回アディポサイエンス・シンポジウム(2015年8月)

青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、富岡恵、平池勇雄、藤田隆教、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝：「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介した PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」

- 15) 第 15 回 東京大学生命科学シンポジウム (2015 年 6 月)

青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、孫威、平池 勇雄、藤田隆教、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝：「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介した PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」

- 16) 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2015 年 5 月)

青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、孫威、平池 勇雄、藤田隆教、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝：(シンポジウム 18 若手医師研究者シンポジウム)「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介した PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」

- 17) 第 88 回日本内分泌学会学術総会 (2015 年 4 月)

青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、于静、武和巳、孫威、富岡恵、藤田隆教、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、植木浩二郎、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝：(シンポジウム 18) 若手医師研究者シンポジウム：「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介した PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」

- 18) 第 52 回 日本臨床分子医学会 年次学術集会 (2015 年 4 月)(学術奨励賞)

青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上剛、中村正裕、和田洋一郎、堤修一、児玉龍彦、酒井寿郎、油谷浩幸、門脇孝：「脂肪細胞における遠位エンハンサーを介した PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析」

〔図書〕(計 1 件)

青山倫久、脇裕典、山内敏正、門脇孝：肥満関連ゲノム領域と FTO/IRX3 の関連と意義。内分泌・糖尿病・代謝内科 40 巻 4 号 306-311, 2015.4

〔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://dm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし