

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16102

研究課題名（和文）1細胞核クロマチン構造解析による褐色脂肪分化の制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Identification of Transcription factors in brown adipose cell differentiation by single-nucleus chromatin analysis

研究代表者

中村 正裕（NAKAMURA, MASAHIRO）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・特任助教

研究者番号：40634449

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化各段階におけるシングル核クロマチン構造解析及びシングル核発現解析を行った。まず、これらの遺伝子発現変化を指標として、クロマチン構造変化を同定し、新規転写因子の同定へとつなげ、それら新規転写因子とクロマチン構造変化の関わりを解明を試みた。まず分化各時期特異的な遺伝子発現を同定することができた。褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化各段階における、オープンクロマチン領域を改良版ATAC-seqを用いて1細胞毎に同定することを行い、分化各時期特異的なオープンクロマチン領域を同定し、転写因子のモチーフが濃縮していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化各段階におけるシングル核クロマチン構造解析及びシングル核発現解析を行い、褐色脂肪細胞分化を促進させる新規転写因子を同定し、新規転写因子が褐色脂肪細胞のクロマチン構造をどう変化させるのかを、少数細胞を用いたChIP-seq解析およびシングルセル発現解析を用いることによって明らかにすることを目的とした。褐色脂肪細胞分化をモデルケースとして、転写因子のオンオフやエピゲノム変化が分化関連遺伝子の発現に影響を及ぼし、さらなるエピゲノム変化を引き起こして分化を制御している過程の一部を詳細に示すことができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed single-nucleus chromatin structure and single-nucleus expression at each stage of differentiation from brown fat precursor cells to brown fat cells. First, we used these gene expression changes as indicators to identify chromatin structural changes, which led to the identification of novel transcription factors, and then we attempted to elucidate the relationship between these novel transcription factors and chromatin structural changes. First, we were able to identify gene expression specific to each stage of differentiation. We identified open chromatin regions at each stage of differentiation from brown adipose progenitor cells to brown adipocytes on a cell-by-cell basis using an improved version of ATAC-seq. We identified open chromatin regions specific to each stage of differentiation and found that transcription factor motifs are enriched in these regions.

研究分野：エピゲノム研究

キーワード：クロマチン シングルセル 遺伝子発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では、今までは細胞数が少なく解析が困難であった、褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化各段階におけるシングル核クロマチン構造解析(オープンクロマチン領域の同定)及びシングル核発現解析を行い、褐色脂肪細胞分化を促進させる新規転写因子を同定していく。また、新規転写因子が褐色脂肪細胞のクロマチン構造をどう変化させるのかを、少数細胞を用いた ChIP-seq 解析およびシングルセル発現解析を用いることによって明らかにする。

### 2. 研究の目的

マウス褐色脂肪細胞分化過程において各々のクロマチン構造がどのような順番で変化していくかは知られていない。申請者は、マウス褐色脂肪細胞化過程におけるクロマチン構造の変化に興味を持ち、1-100 細胞程度の微量細胞数を用いたクロマチン構造解析法を完成させた。本研究では、今までは細胞数が少なく解析が困難であった、褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化各段階におけるシングル核クロマチン構造解析(オープンクロマチン領域の同定)及びシングル核発現解析を行い、褐色脂肪細胞分化を促進させる新規転写因子を同定していく。また、新規転写因子が褐色脂肪細胞のクロマチン構造をどう変化させるのかを、少数細胞を用いた ChIP-seq 解析およびシングルセル発現解析を用いることによって明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化各段階におけるシングル核クロマチン構造解析(オープンクロマチン領域の同定)及びシングル核発現解析を行い、褐色脂肪細胞分化を促進させる新規転写因子を同定し、新規転写因子が褐色脂肪細胞のクロマチン構造をどう変化させるのかを、少数細胞を用いた ChIP-seq 解析およびシングルセル発現解析を用いることによって明らかにすることを目的とした。申請者は準備として、褐色脂肪細胞核におけるシングル核発現解析を行い、1 細胞毎に各々遺伝子発現が大きく異なることを見出している。そこで、これらの遺伝子発現変化を指標として、(a)クロマチン構造変化を同定し、(b)新規転写因子の同定へとつなげ、(c)(d)それら新規転写因子とクロマチン構造変化の関わりを解明する研究計画としている。まず、これらの遺伝子発現変化を指標として、(a)クロマチン構造変化を同定し、(b)新規転写因子の同定へとつなげ、(c)(d)それら新規転写因子とクロマチン構造変化の関わりを解明を試みた。

申請者は準備として、褐色脂肪細胞核におけるシングル核発現解析を行い、1 細胞毎に各々遺伝子発現が大きく異なることを見出している。そこで、これらの遺伝子発現変化を指標として、(a)クロマチン構造変化を同定し、(b)新規転写因子の同定へとつなげ、(c)(d)それら新規転写因子とクロマチン構造変化の関わりを解明する(図 4)。(a)褐色脂肪分化におけるオープンクロマチン領域の同定(クロマチン構造解析)褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化各段階における、オープンクロマチン領域を改良版 ATAC-seq を用いて 1 細胞毎に同定する。タイムポイントとして、分化前(Day0)、分化初期(Day1-2)、分化中期(Day4)、分化後期(Day6-8)を選択し、各時期特異的なオープンクロマチン領域を同定する。(b)褐色脂肪分化を促進させる新規転写因子の同定(a)で同定したオープンクロマチン領域は、転写因子が結合しやすい領域であり、転写因子結合モチーフを多く含んでいる。そこで申請者らが脂肪分化細胞解析の際に用いた EM アルゴリズム(expectation maximization algorithm)を利用し、新規転写

因子モチーフを同定する。(c) 新規転写因子の褐色脂肪分化における役割の解明 (b)で同定した新規転写因子や、シングル核発現解析で得られた候補転写因子について、褐色脂肪各分化段階における ChIP-seq を行い、新規転写因子がいつゲノム上のどの位置に結合するか同定し、オープンクロマチン領域とのオーバーラップを検証する。また siRNA / 発現プラスミドを用い転写因子の発現を調節し、シングル核発現解析を行い、分化度を比較する。これら転写因子の褐色脂肪分化における役割の解明を目指す。

#### 4 . 研究成果

タイムポイントとして、分化前(Day0)、分化初期(Day1-2)、分化中期(Day4)、分化後期(Day6-8)を選択し、各時期特異的な遺伝子発現を同定することができた。次に、(a)褐色脂肪分化におけるオープンクロマチン領域の同定(クロマチン構造解析) 褐色脂肪前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化各段階における、オープンクロマチン領域を改良版 ATAC-seq を用いて 1 細胞毎に同定することを行っている。タイムポイントとして、分化前(Day0)、分化初期(Day1-2)、分化中期(Day4)、分化後期(Day6-8)を選択し、各時期特異的なオープンクロマチン領域を同定することができており、ポジティブコントロールとなる転写因子のモチーフが濃縮していることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------