

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791020
 研究課題名（和文）
 次世代シーケンサーによる脂肪細胞特異的な転写制御調節機構の研究
 研究課題名（英文）
 Analysis of adipocyte-specific transcriptional gene regulation by using next generation sequencer
 研究代表者
 脇 裕典（WAKI HIRONORI）
 東京大学・医学部附属病院 特任准教授
 研究者番号：00466765

研究成果の概要（和文）：

脂肪細胞に特異的な転写制御調節機構を、次世代シーケンサーを用いてオープンクロマチン領域を検出する FAIRE-seq や、ヒストン修飾、PPAR γ の結合を検出する ChIP-seq を施行した。従来の方法で明らかにされなかった標的遺伝子の遠位に存在する脂肪細胞特異的転写制御領域の重要性が明らかとなった。また FAIRE-seq とモチーフ解析の組み合わせは脂肪細胞特異的転写制御因子のバイアスのない同定に有効であり、脂肪細胞分化を制御する新規転写因子として NFI ファミリーを同定した。

研究成果の概要（英文）：

We generated genome-wide maps of open chromatin, histone modifications and PPAR γ binding sites in 3T3-L1 adipocytes using FAIRE-seq and ChIP-seq. The data suggest that regulatory elements located distal to target genes play a critical role in adipocyte-specific gene regulation. We also demonstrated that a combination of motif analysis and FAIRE-seq provides unbiased identification of regulators of adipocyte-specific gene expression and reported identification of the NFI transcription family as a novel regulator of adipocyte differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：分化、遺伝子、ゲノム、糖尿病、脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーによる高速シーケンシングを転写因子結合部位を特異抗体により濃縮するクロマチン免疫沈降(ChIP, chromatin immunoprecipitation)と組み合わせることにより (ChIP-seq)、全ゲノムレベルでの転写因子結合部位の解析が可能となり、これまで既存の研究手法とは全く異なる新しい角度から、様々な転写因子やエピジェネティクスによる遺伝子の転写調節機構が明らかにされつつある。

2. 研究の目的

脂肪細胞分化のエピジェネティクスによる制御機構を解明する一環で、PPAR γ のゲノムワイド解析の施行を試みた。PPAR γ とRXR α はゲノム上でヘテロダイマーを形成していること、PPAR γ とRXR α の結合領域の近傍の遺伝子は、脂肪細胞分化で誘導され、分化や脂質代謝に関わる遺伝子が濃縮されていることをゲノムワイド解析において明らかにしてきた(data not shown)。本研究ではこの検討をより発展させ、オープンクロマチン領域を検出する FAIRE-seq など新しい手法や、バイオインフォマティクスによるモチーフ解析を通して、脂肪細胞特異的な転写制御機構の統合的な理解と、新規転写因子のネットワークを明らかにする。

3. 研究の方法

ゲノム発現制御領域に特徴的なオープンクロマチン領域を検出する FAIRE(Formalin-assisted Isolation of Regulatory Elements)の系を確立し、次世代シーケンサーを組み合わせた FAIRE-seq を 3T3-L1 脂肪細胞において施行し、ゲノムワイドにオープンクロマチン領域の同定を行った。また PPAR γ やRXR α に対するクロマチン免疫沈降 ChIP-seq を用いて、これらの因子のゲノム上の結合部位を同定する。

4. 研究成果

3T3-L1 脂肪細胞(分化前、後)と NIH-3T3 線維芽細胞のゲノム上のオープンクロマチン領域を FAIRE-seq を用いて同定を行った。ヒストン修飾や、マスターレギュレーターPPAR γ の結合領域を ChIP-seq を用いて同定した。(図 1)。

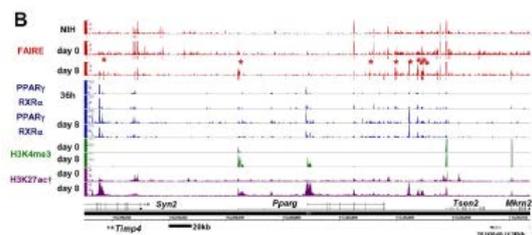


図 1

Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K-i, Yu J, et al. (2011) Global Mapping of Cell Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation. PLoS Genet 7(10): e1002311.より引用

非プロモーター領域のオープンクロマチン領域はエンハンサー型のヒストン修飾を持ち、イントロンなどゲノム上に幅広く分布していた。プロモーター領域に対し、非プロモーターのオープンクロマチン領域は細胞種や分化により大きく変化し、これらの領域の細胞特異的な転写制御における役割が示唆された。分化に伴い強く誘導される遺伝子の周囲には、複数の脂肪細胞特異的な非プロモーターオープンクロマチン領域がクラスターを形成して存在した(data not shown)。

PPAR γ 遺伝子領域では従来の方法で同定されなかった+19, +22, +24, +50, +53kbの脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域領域を認めた(図 1)。

一方、脂肪細胞特異的な FAIRE ピークに対するモチーフ解析では、PPAR γ やC/EBP 以外に脂肪細胞での役割が未知の転写因子 NF-I ファミリーの結合配列が濃縮していた。(表 1)

Motif	Name	Corrected p-value	Enrichment Ratio (AdipAd)
M01193	NF-1	7.0E-27	1.60
M01196	CTF1 (NF-1)	5.1E-22	1.55
M01100	LRF	2.6E-20	1.65
M00528	PPAR	2.7E-12	2.14
M01728	EAR2	1.2E-09	1.47
M01031	HNF4 (PPAR)	3.8E-08	2.06
M01772	C/EBP	1.7E-07	2.69
M00109	C/EBPbeta	3.1E-07	1.51
M00121	USF/Tcf4 Maxic-Myc	6.3E-07	1.52
M00491	MAZR	2.1E-05	1.29

表 1

Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K-i, Yu J, et al. (2011) Global Mapping of Cell Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation. PLoS Genet 7(10): e1002311.より引用

ChIP アッセイではNFIが、PPAR γ やC/EBP α 、aP2 近傍の脂肪細胞特異的 FAIRE ピーク /PPAR γ 結合領域に存在し、3T3-L1 細胞における NFIA の過剰発現ではこれらの遺伝子が誘導され、分化誘導刺激前に脂肪滴形成を認めた。(図 3)

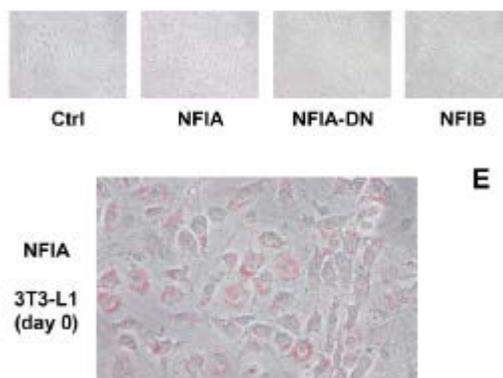


図 3

Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi KI, Yu J, et al. (2011) Global Mapping of Cell Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation. PLoS Genet 7(10): e1002311.より引用

一方ドミナントネガティブ型 NFIA の過剰発現や NFIA・NFIB のノックダウンにより脂肪細胞分化が抑制され、これらの因子の生理的な役割が示唆された。

FAIRE-seq は細胞特異的な転写制御領域のゲノムワイド解析と新規制御因子の同定に有用であった。

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 2 件)

- 1) Hironori Waki, Masahiro Nakamura, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Jing Yu, Lisa Hirose-Yotsuya, Kazumi Take, Wei Sun, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Takanori Fujita, Tomohisa Aoyama, Shuichi Tsutsumi, Kohjiro Ueki, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani, Takashi Kadowaki. Global Mapping of Cell Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation. PLoS Genet (査読あり) 7(10), 2011, e1002311.

- 2) Waki H, Yamauchi T, Kadowaki T. The Epigenome and Its Role in Diabetes. Curr Diab Rep. (招待) 72012 Oct 16. DOI 10.1007/s11892-012-0328-x

[学会発表] (抜粋、計 4 件)

Keystone Symposia, Genetic and Molecular Basis of Obesity and Body Weight Regulation (J7) Epigenetics (2012.1.29-2.3, Santa Fe)(Short talk)

Hironori Waki, Masahiro Nakamura, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Jing Yu, Lisa Hirose Yotsuya, Kazumi Take, Wei Sun, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Takanori Fujita, Tomohisa Aoyama, Shuichi Tsutsumi, Kohjiro Ueki, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani, and Takashi Kadowaki
Global Mapping of Cell-Type-Specific Open Chromatin by FAIRE-seq Reveals the Regulatory Role of the NFI Family in Adipocyte Differentiation

第 17 回アディポサイエンス研究会 (2012 年 8 月 25 日 大阪) (口演発表)

「脂肪細胞分化におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割」

脇 裕典

第 33 回日本肥満学会 (2012 年 10 月 12 日 京都) (口演発表)

シンポジウム 8【Adiposcience の新展開: 肥満症の基礎研究】

脂肪細胞分化におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割

脇 裕典、中村 正裕、山内 敏正、若林 賢一、于 静、四谷 理沙、武 和巳、孫 威、岩部 真人、岡田 美紀、藤田 隆教、青山 倫久、堤 修一、植木 浩二郎、児玉 龍彦、酒井 寿郎、油谷 浩幸、門脇 孝

第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11 日 福岡) (口演発表)

ワークショップ: 代謝と生活習慣病をつなぐエピジェネティクス制御機構 Epigenetic mechanism linking metabolism and life-style disease

脂肪細胞分化におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割

脇 裕典

(3)連携研究者
無し

〔図書〕(計3件)

脇 裕典
脂肪細胞分化特異的エンハンサーのゲノム
ワイド解析と分化における NFI の役割
糖尿病学 2012 35-43, 2012

脇 裕典
Keystone Symposia, Genetic and Molecular
Basis of Obesity and Body Weight Regulation
(J7), Pathogenesis of Diabetes (J8)に参加して
「肥満研究」Vol. 18 No. 1, 61-65, 2012.

脇 裕典、山内敏正、門脇 孝. 白色脂肪
細胞のエピジェネティクス. 医学のあゆみ
242(12) 褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞
p918-923, 2012

〔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://researchmap.jp/hironori.waki/?lang=japanese>

6. 研究組織

(1)研究代表者

脇 裕典 (WAKI HIRONORI)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：00466765

(2)研究分担者

無し