

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860742

研究課題名(和文) 3C法による脂肪細胞におけるC/EBP 遺伝子領域の高次クロマチン構造の解析

研究課題名(英文) Analysis of higher-order chromatin structure of the C/EBP α gene locus in adipocytes by 3C (Chromosome Conformation Capture) technique

研究代表者

青山 倫久 (AOYAMA, TOMOHISA)

東京大学・医学部附属病院・研究員

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)：脂肪細胞の分化においてマスターレギュレーターである転写因子PPAR とC/EBP のポジティブフィードバックループは重要な役割を果たすが、PPAR によるC/EBP 遺伝子の転写制御機構は現在まで不明であった。ゲノムワイドにPPAR α 結合領域を同定する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法による解析などから、既存の手法では明らかでなかったC/EBP 遺伝子の下流に存在する複数の機能的な遠位エンハンサーを同定し、転写制御において遠位エンハンサーとプロモーターのヒストン修飾やクロマチン構造、同領域間のクロマチンループのダイナミックな変化の関与が示唆された。

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 crucial, the precise mechanism by which PPAR regulates Cebpa gene expression remains elusive. Here, we performed ChIP-seq using PPAR antibodies and identified specific functional enhancers in the distal downstream region of the Cebpa gene in differentiated 3T3-L1 adipocytes. These regions exhibited increased histone H3 acetylation and chromatin accessibility (as judged by FAIRE-qPCR) during differentiation. 3C (Chromosome Conformation Capture) assays revealed physical interactions between these distal enhancers and the promoter of the Cebpa gene, which were enhanced upon differentiation. Our findings suggest that transactivation of C/EBP expression by PPAR involves distal enhancers, long-range DNA looping and hierarchical epigenetic changes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子 転写制御 高次クロマチン構造 3C 脂肪細胞 分化 糖尿病 肥満

1. 研究開始当初の背景

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ており、中でもマスターレギュレーターである PPAR γ と C/EBP α の相互の転写活性化による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。C/EBP α による PPAR γ の転写制御に関しては、PPAR γ 遺伝子の近位プロモーター領域に C/EBP が結合し制御し得る領域が同定されている。一方、PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御領域(エンハンサー)は現在まで不明であった。

近年開発された次世代シーケンサーとゲノム上の転写因子の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を組み合わせた ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation sequencing)により、ゲノムワイドな転写因子の結合部位の解析が可能となり、遺伝子発現の制御領域がこれまで解析が行われてきた近位プロモーター領域以外にもゲノム上に広範囲に分布しており、「遠位」エンハンサーの重要性が明らかにされつつある(Waki H et al. PLoS Genet 2011; 7: e1002311)。

これらの標的遺伝子から(1次元的に)離れたエンハンサー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領域がクロマチンループを形成し直接3次元的に近接して相互作用する「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いる(Nat Genet 2002;32, 555-6)。Dekker らはこの様なクロマチンの高次構造(核内でのゲノム領域間の3次元的な近接関係)の解析法として 3C (Chromosome Conformation Capture)法を報告している(Science 2002; 295, 1306-11)。

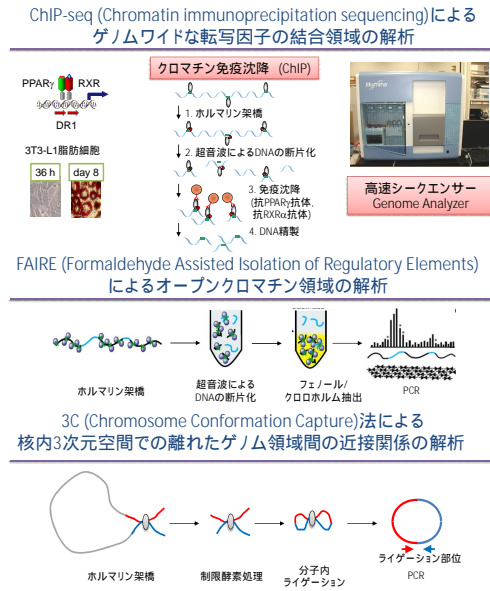
2. 研究の目的

本研究ではゲノムワイドに PPAR γ 結合領域を同定する 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 PPAR γ のゲノムワイドな結合領域を ChIP-seq、オープンクロマチン構造を FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements)、核内でのゲノム領域間の3次元的な近接関係を 3C 法により解析した(図1)。3C 法は、ホルマリンによる DNA-タンパク質の架橋、制限酵素による断片化、希釈後に近接関係にあるゲノム領域間のライゲーションを行い PCR 法により検出する(図1)。

図 1



4. 研究成果

3T3-L1 脂肪細胞における ChIP-seq による PPAR γ 結合部位のゲノムワイドな解析(東大先端科学技術研究センター)では、既存のアプローチでは明らかでなかった C/EBP α 遺伝子の下流の遠位領域(+3, +19, +22, +24, +50, +53kb)に複数の PPAR γ 結合部位を同定した。同部位にはゲルシフト解析で PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーと結合し、ルシフェラーゼ解析で転写活性化能を有する PPAR 応答配列が存在した。脂肪細胞分化に伴いこれらの領域は、ChIP や FAIRE で活性型のエンハンサーに特徴的なヒストン修飾やオープンクロマチン構造のダイナミックなエピジェネティック変化を認めた。これらの標的遺伝子から(1次元的に)離れたエンハンサー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領域がクロマチンループを形成し直接3次元的に近接して相互作用する「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いる(Nat Genet 2002;32, 555-6)。また、クロマチンループの機序として、DNA 結合タンパクである CTCF はホモダイマーを形成しゲノム DNA のループ構造の形成を介して、インスレーター作用など様々な転写制御に関与することが知られているが、最近、エンハンサー・プロモーター間のループを形成する事で、遺伝子発現を制御する機構が提唱されている(Nat Genet 2011;43, 630-8)。実際に ChIP-seq による C/EBP α 遺伝子周囲の CTCF の結合領域の検討では、遺伝子のプロモーター及び、PPAR γ が結合する遠位エンハンサーの一部とオーバーラップする領域に CTCF の結合部位を認めた。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脂肪細胞分化に伴い増強する近接関係を認め、同領域間にクロマチンループの形成が示唆された。ま

た、これらの近接関係は PPAR_γ や CTCF のノックダウンにより減弱することから、両者のクロマチンループへの関与が示唆された。実際に PPAR_γ や CTCF のノックダウンにより、遠位エンハンサーとプロモーターのオープンクロマチン構造に減弱を認め、C/EBPα 遺伝子の発現低下や、Oil Red O 染色で脂肪細胞分化に抑制を認めた。

以上の結果から、PPAR_γ は C/EBPα 遺伝子下流の遠位エンハンサーに結合し、転写制御において遠位エンハンサーとプロモーターのヒストン修飾やクロマチン構造、PPAR_γ や CTCF 依存的な遠位エンハンサー・プロモーター間のクロマチンループが関与することが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 14 件)

- 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(2015 年 2 月 13 日 京都)(口演発表) 若手研究奨励賞
青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上 剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡 恵、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、藤田隆教、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/EBPα 遺伝子の転写制御機構の解析」
- 1) The 4D Nucleome 2014 (2014.12.18, Hiroshima, Japan)(poster)
Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Kazumitake, Wei Sun, 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/EBPα Gene Expression by PPAR_γ through Distal Enhancers during Adipocyte Differentiation
 - 2) 第 35 回日本肥満学会(2014 年 10 月 24 日 宮崎)(口演発表)
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、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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/EBPα 遺伝子の転写制御機構の解析」

- 3) 第 29 回日本糖尿病合併症学会(2014 年 10 月 3 日 東京)(口演発表)
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、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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/EBPα 遺伝子の転写制御機構の解析」
- 4) 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress, (2014.9.14, Kyoto, Japan)(poster)
Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Kazumitake, Wei Sun, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Ueki Kohjiro, Youichiro Wada, Shuichi Tsutsumi, Tatsuhiko Kodama, Juro Sakai, Hiroyuki Aburatani and Takashi Kadowaki: Long-Range Transactivation of C/EBPα Gene Expression by PPAR_γ through Distal Enhancers during Adipocyte Differentiation
- 5) 第 18 回アディポサイエンス・シンポジウム(2014 年 8 月 23 日 大阪)(ポスター発表)
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、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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/EBPα 遺伝子の転写制御機構の解析」
- 6) 第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー(2014 年 7 月 11 日 山梨)(ポスター発表)
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、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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/EBPα 遺伝子の転写制御機構の解析」
- 7) American Diabetes Association 74th Scientific Sessions (San Francisco, USA, 2014.6.15)(poster)
Tomohisa Aoyama, Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Ken-ichi Wakabayashi, Tsuyoshi Inoue, Masahiro Nakamura, Jing Yu, Kazumitake, Wei Sun, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, 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
- 8) 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2014 年 5 月 24 日 大阪)(口演発表表)
 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、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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」
- 9) 第 87 回日本内分泌学会学術総会 (2014 年 4 月 24 日 福岡)(口演発表) 若手研究奨励賞
 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上 剛、中村正裕、于静、武和巳、富岡恵、孫威、平池勇雄、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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」
- 10) 第 34 回日本肥満学会 (2013 年 10 月 11 日 東京)(ポスター発表)
 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、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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」
- 11) 第 18 回 アディポサイエンス・シンポジウム (2013 年 8 月 24 日 大阪)(ポスター発表) 若手優秀研究奨励賞
 青山倫久、脇裕典、山内敏正、若林賢一、井上 剛、中村正裕、于静、武和巳、孫威、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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」
- 12) 第 13 回 東京大学生命科学シンポジウム BIO UT (2013 年 6 月 8 日 東京)
 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、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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」
- 13) 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2013 年 5 月 17 日 熊本)(口演発表)
 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、岩部真人、岩部美紀、藤田隆教、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」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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・特任研究員
 研究者番号：50645538
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし