

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 青 山 倫 久

【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、マスターレギュレーターである PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) や C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α) が相互に転写活性化するポジティブフィードバックループが中心的な役割を果たすと考えられている。C/EBP α による PPAR γ 遺伝子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 α が結合し制御し得る領域が同定されているが、PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御領域に関しては現在まで同定されていなかった。

近年開発された高速シーケンサーと、特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)を組み合わせた ChIP-seq により、転写因子の結合領域やヒストン・DNAの修飾領域の「全ゲノムレベル」での解析が可能となった。ゲノムワイドな転写因子の結合領域やヒストン修飾領域の解析から、遺伝子発現の制御領域が、通常のプロモーター解析が行われる近位プロモーター領域以外にも、イントロンや遺伝子間といった遺伝子から遠く離れた遠位領域など、広範囲にゲノム上に分布しており、これらの遠位エンハンサーの重要性が明らかになりつつある。本研究で私は、3T3-L1脂肪細胞における PPAR γ /RXR α の ChIP-seq を用いて、PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御機構を検討した。

【結果】まず 3T3-L1 細胞において PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の発現制御を検討したところ、C/EBP α 遺伝子の発現は PPAR γ アゴニストである Rosiglitazone の添加により亢進した。この発現亢進は PPAR γ の標的遺伝子である FABP4 と同様に 3 時間という比較的短時間で見られることから、PPAR γ による直接の転写制御であることが示唆された。また、C/EBP α 遺伝子の発現は PPAR γ の過剰発現で有意に増加し、逆に PPAR γ のノックダウンにより低下を認めることから、C/EBP α 遺伝子の発現が PPAR γ により制御されることが示唆された。

脂肪細胞における PPAR γ /RXR α の ChIP-seq によるゲノムワイド解析では、PPAR γ /RXR α 結合部位は、通常のプロモーター解析が行われる -5kb 上流に存在するものは 13%であり、イントロン 34%、遠位領域 28%などとゲノム上に広範囲に分布しており、PPAR γ /RXR α 結合部位の大多数は今まで考えられていた以上に、遺伝子から遠く離れた遠位領域に存在することが示唆された。また、PPAR γ /RXR α 結合部位数と標的遺伝子の発現の関係をゲノムワイドに検討すると、分化に伴う遺伝子発現変化が強い程、1 遺伝子あたりの PPAR γ の結合数が多く、また 1 遺伝子あたりの PPAR γ の結合数が多い程、標的遺伝子の発現上昇が多く認められ、制御領域の「数」が標的遺伝子の発現制御の程度を規定する重要な因子の一つであることが示唆された。

次に C/EBP α 遺伝子領域における PPAR γ /RXR α の結合部位に注目すると、通常のプロモーター解析が行われる近位プロモーター領域には PPAR γ /RXR α 結合部位は存在せず、C/EBP α 遺伝子の転写開始点下流の遠位領域に +3, +19, +22, +24, +50, +53kb の複数の PPAR γ /RXR α 結合ピークを認めた(図 1A)。同部位には PPAR 応答配列である DR1 様モチーフが複数個存在し、ゲルシフト解析で PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーと結合を認め、ルシフェラーゼ解析にて PPAR γ アゴニストである Rosiglitazone 依存的に転写活性化能を有することから、PPAR 応答配列として機能し得ることが示唆された。

PPAR γ による標的遺伝子の発現制御機構としては、PPAR γ にリガンドが結合することにより転写活性共役因子(コアクチベーター)複合体が結合し、ヒストン修飾やクロマチン構造変化を伴って RNA ポリメラーゼ II が活性化され、標的遺伝子の転写が促進されると考えられている。今回同定した C/EBP α 遺伝子領域の PPAR γ /RXR α 結合部位にこのようなヒストン修飾の状態の変化やクロマチン構造変化がみられるかどうかを検討する目的で、活性型のエンハンサーやプロモーター領域に認められるヒストンアセチル化抗体(H3K27Ac 及び H3K9Ac)を用いた ChIP-qPCR や、オープンクロマチン構造を検出する FAIRE (formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements) -qPCR を行ったところ、脂肪細胞分化前では、C/EBP α 遺伝子のプロモーター領域のクロマチンは開いた状態であるがヒストンアセチル化は少なく、遠位の PPAR γ /RXR α 結合部位では開いたクロマチン構造を認めず、ヒストンアセチル化も少ない。脂肪細胞分化にともなう PPAR γ の発現上昇に従って、遠位の PPAR γ /RXR α 結合部位ではヒストンのアセチル化の増加、開いたクロマチン構造への変化を認め、プロモーター領域でもヒストンアセチル化の増加が起これ、これらのヒストン修飾やクロマチン構造の変化により C/EBP α の mRNA 転写が促進されると考えられた(図 1B)。

離れた転写制御領域による遺伝子発現制御機構として、遠位転写制御領域とプロモーター領域がループを形成し直接空間的に近接して相互作用するという「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。一方、インシュレーター結合タンパク質である CTCF (CCCTC-binding factor) は転写活性/抑制、インスレクション、インプリンティング、X 染色体不活性化などの様々な制御を行うことが知られているが、最近、Wei らにより ES 細胞において CTCF を介したクロマチンループの全ゲノム解析が行われ、CTCF の新しい作用様式としてエンハンサー・プロモーター間のルーピングを促す様式が提唱されている。3T3-L1 脂肪細胞における CTCF 結合領域の ChIP-seq のデータを C/EBP α 遺伝子領域で解析すると、プロモーター領域、及び +50kb (CTCF1 とする)、+53kb (CTCF2 とする)において CTCF 結合ピークを認め、+50kb の結合部位 (CTCF1) は PPAR γ /RXR α 結合部位とオーバーラップしていた。CTCF 抗体を用いた ChIP-qPCR においても、これらのプロモーター領域及び CTCF1、CTCF2 に CTCF の結合が確認され、更にこれらの領域の塩基配列解析で同部位にそれぞれ複数個の CTCF 結合モチーフ候補を認めた。次に C/EBP α 遺伝子領域におけるプロモーターと CTCF1/CTCF2 間の相互作用を検討する目的で、Chromatin Conformation Capture (3C) による解析を行った結果、プロモーター領域と CTCF1/CTCF2 を含むゲノム領域の間にシグナルが検出され、C/EBP α のプロモーター領域と遠位の CTCF1/CTCF2 の間で相互作用している可能性が示唆された。CTCF の発現は脂肪細胞の分

化前後で認められ、同領域間の相互作用も分化前後で認められた。実際に PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御に CTCF が関与するかを検討する目的で、3T3L1 脂肪細胞において CTCF のノックダウンを行ったところ、C/EBP α 遺伝子の発現に抑制を認め、更にヒストンアセチル化抗体(H3K27Ac) に対する ChIP-qPCR で PPAR γ /RXR α 結合部位のヒストンアセチル化に減弱を認めた。

【結論】 今回の脂肪細胞での検討で、ゲノムワイド ChIP-seq による解析が、既存のアプローチでは明らかでなかった C/EBP α 遺伝子領域の複数の遠位エンハンサーの同定に有効であった。また C/EBP α 遺伝子のプロモーター領域と遠位の PPAR γ /RXR α 結合部位の間にクロマチン相互作用を認めた。分化においてこれらの領域はダイナミックなヒストンのアセチル化やオープンクロマチン構造の変化を伴っており、PPAR γ による遠位エンハンサーを介した C/EBP α 遺伝子の転写制御において、最近提唱された CTCF によるエンハンサー・プロモーター間のルーピングが重要な役割を果たす可能性が示唆された (図 2)。

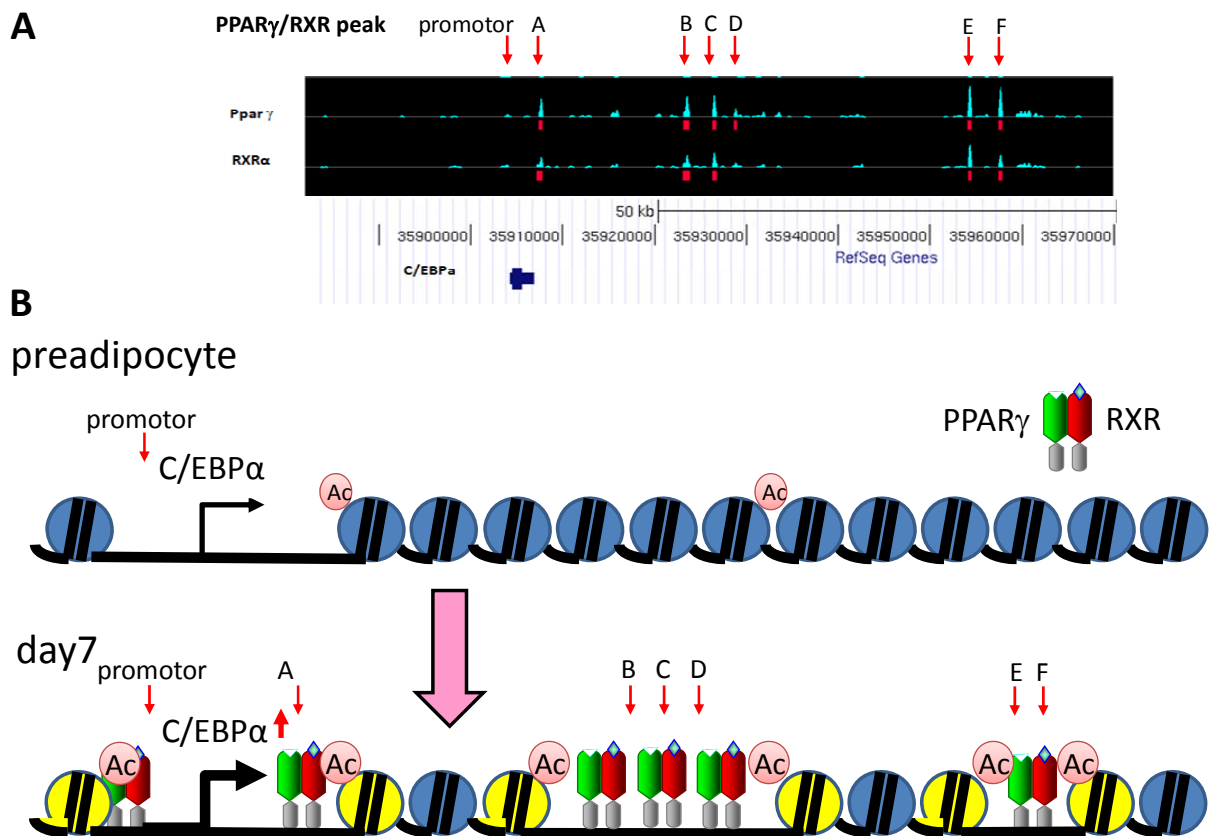


図 1. C/EBP α 遺伝子の遠位の PPAR γ /RXR α 結合部位と分化に伴うヒストン修飾・クロマチン構造変化

A : C/EBP α 遺伝子領域における PPAR γ /RXR α 結合部位ピーク

B : PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の発現制御機構の模式図

脂肪細胞分化前後で C/EBP α 遺伝子のプロモーター領域のクロマチンは開いた状態のままであるのに対し、C/EBP α 遺伝子領域遠位の PPAR γ /RXR α 結合部位については、分化前に比較して分化後でクロマチンがより開いていた状態に変化する。ヒストンアセチル化も分化前と比較して分化後で多く認められる。Ac : ヒストンアセチル化

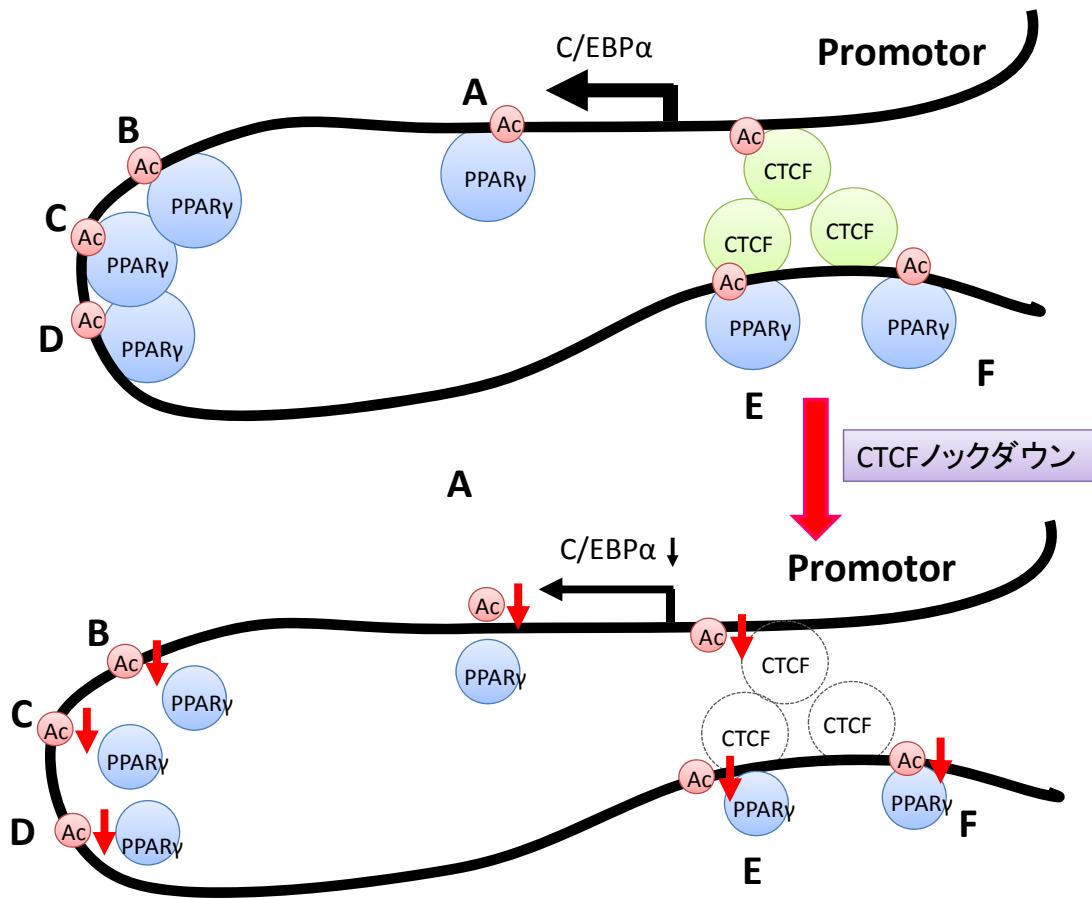


図2. 遠位エンハンサーを介した PPAR γ による C/EBP α 遺伝子の転写制御のモデル

C/EBP α 遺伝子のプロモーターと遠位の PPAR γ 結合部位（エンハンサー）がクロマチンループにより近接することで、C/EBP α 遺伝子の発現が制御される。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ヒストンアセチル化は低下し、C/EBP α 遺伝子の発現が低下する。 Ac: ヒストンアセチル化