

審査の結果の要旨

氏名 青 山 倫 久

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 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であるが、PPAR γ によるC/EBP α の転写制御機構は不明であった。本研究は、ChIP-seqを用いて3T3-L1脂肪細胞におけるPPAR γ /RXR α 結合領域のゲノムワイド解析を行い、PPAR γ によるC/EBP α 遺伝子の転写制御機構の解析を試み、以下の結果を得ている。

1. 3T3-L1脂肪細胞において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、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 の発現はPPAR γ の過剰発現にでも有意に増加し、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。
2. 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の結果から、PPAR γ /RXR α 結合部位は、コンベンショナルな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 結合領域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。
3. C/EBP α 遺伝子領域においては、近位プロモーター領域にはPPAR γ /RXR α 結合領域は存在せず、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。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。

4. C/EBP α 遺伝子領域のPPAR γ /RXR α 結合部位において、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を行った結果、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 結合領域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 結合領域では、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り、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 遺伝子の転写が促進されると考えられた。

5. 遠位エンハンサーを介した遺伝子の転写制御機構に関して、2011年にWeiらによりES細胞においてインシュレーター結合タンパク質である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。本研究では、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 遺伝子領域で解析し、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結合ピークを同定し、+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、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。更にChromatin Conformation Capture (3C) による解析から、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。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。

以上、本論文はゲノムワイド ChIP-seq による解析により、既存のアプローチでは明らかでなかった C/EBP α 遺伝子領域の遠位に複数のエンハンサーを同定した。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 結合部位の間のクロマチン相互作用を示した。脂肪細胞の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を示した。本研究は転写因子による脂肪細胞分化の制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。