

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15768

研究課題名（和文）コヒーシンローダーによるスーパーエンハンサーを介した遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Gene expression control mechanism via super-enhancer by cohesin loader

研究代表者

坂田 豊典（Sakata, Toyonori）

東京大学・定量生命科学研究所・特任助教

研究者番号：40795530

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）：コヒーシンとそのローダーは遺伝子の転写制御などの染色体機能に寄与しており、これらの変異はCornelia de Lange Syndrome (CdLS) という発生疾患の原因となるが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究ではHi-C、HiChIP及びMicro-Cによる染色体高次構造解析を行い、コヒーシンが多くのエンハンサーとプロモーター間のループに必須であること、CdLSにおいては発現減少遺伝子において特にsuper-enhancerとプロモーター間のループが減弱していることを見出した。これらの結果から、CdLSにおける転写制御異常のメカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、コヒーシンが多くのエンハンサーとプロモーター間のループに必須であること、Cornelia de Lange Syndrome (CdLS) においては発現減少遺伝子において特にsuper-enhancerとプロモーター間のループが減弱していることを見出した。これまでにコヒーシン、コヒーシンローダー及びその関連遺伝子の変異によってCdLSをはじめとする発生疾患が引き起こされることが知られていることから、本研究の成果はこのような発生疾患の発症メカニズムの解明や治療法開発において大いに貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Genes coding cohesin complex and its loader complex are mutated in Cornelia de Lange syndrome (CdLS). Although CdLS seems to be caused by misregulation of genes mediated by cohesin and its loader, how these factors regulate transcription remains to be unclear. To approach this point, we performed Hi-C, HiChIP, and Micro-C analyses using a cohesin-depleted cell line and a CdLS patient cell line. We found that cohesin is essential for most of the enhancer-promoter loops. Moreover, we found that the super-enhancer (SE)-promoter loops at down-regulated genes in the CdLS cell line were especially weakened. Taken together with the previous results, it appears that the decrease in cohesin loader in CdLS is expected to decrease the localization of BRD4 in SE, thereby decreasing the enhancer activity, and decreasing cohesin binding, thereby reducing the contact with the promoter. As a result, the expression of neighboring genes may eventually decrease.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：コヒーシン コヒーシンローダー 染色体高次構造 Hi-C HiChIP Micro-C エンハンサー super-enhancer

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) タンパク質は細胞内で複合体を形成しており、染色体が機能する上で種々の中心的な役割を果たすことが知られている。申請者らは SMC 複合体による染色体制御機構の解明を目的として研究を進めており、これまでにその一つであるコンデンシングが転写活性の高い遺伝子領域に結合して、染色体凝縮を促進することを ChIP-seq などの手法を用いて見出した (Sutani & Sakata *et al.*, Nature communications, 2015)。また、別の SMC 複合体である

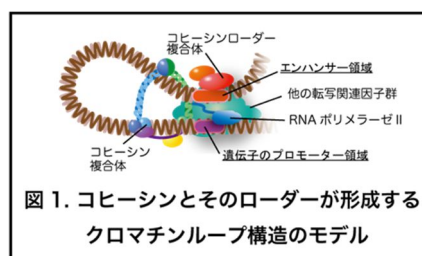


図 1. コヒーシンとそのローダーが形成するクロマチンループ構造のモデル

コヒーシンは遺伝子の転写制御に寄与しており、申請者らのグループは転写のインシュレーターとして機能することを報告した (Wendt *et al.*, Nature, 2008, Jeppsson *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol., 2014)。さらに、コヒーシンは NIPBL/MAU2 コヒーシンローダー複合体によって染色体上にローディングされるが、転写制御においてコヒーシンとそのローダーは遺伝子のプロモーターとエンハンサーが相互作用するためのクロマチンループ構造の形成に機能すると考えられている (図 1)。また、コヒーシンとその関連因子のハプロ遺伝子変異は Cornelia de Lange Syndrome (CdLS) の原因となることも知られており、これは多岐にわたる発生異常を特徴とする遺伝性疾患である。申請者らのグループは CdLS とその類似疾患の原因遺伝子としてコヒーシン脱アセチル化酵素 HDAC8 と転写伸長複合体のサブユニット AFF4 を見出しており

(Deardroff *et al.*, Nature, 2012, Izumi *et al.*, Nat Genet., 2015, 坂田 & 白髭, 生化学, 2017, 実験医学, 2018)、CdLS はコヒーシンとその関連因子による転写制御の異常により引き起こされると考えられている。また、コヒーシンローダーはエンハンサーがクラスター化した SE (super-enhancer) に局在することが明らかとなっており、この SE は ChIP-seq 解析において、転写因子及び転写のメディエーター複合体やヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のアセチル化修飾 (H3K27ac) 等のシグナルが強く観測される領域として定義されている。SE ではこれらの因子が巨大な転写活性化複合体を形成して、近傍の遺伝子の発現制御を行っていると考えられた。そこで、我々はローダーの NIPBL 遺伝子変異型の CdLS 患者由来の線維芽細胞と、ヒト培養細胞 293FT の同遺伝子に変異導入したモデル細胞株を用いて、ChIP-seq 等の網羅的な解析を行った。その結果、これらの変異細胞では、SE 近傍の発生関連遺伝子群の発現が有意に減少しており、SE においてコヒーシン及びそのローダーのクロマチン結合が減少して、H3K27ac のシグナルも低下していることが明らかとなった。また、BRD4 は特に SE に局在して転写を活性化することが知られており、最近では CdLS の新たな原因遺伝子として報告されたが、変異細胞ではこの BRD4 の減少もみられた (図 2)。一方で、「コヒーシン及びコヒーシンローダーが BRD4 をはじめとする他の転写制御因子群と共に、どのように SE の形成や維持に寄与しているのか、また、SE がどのように遺伝子発現を制御しているのか」は未だに不明であった。

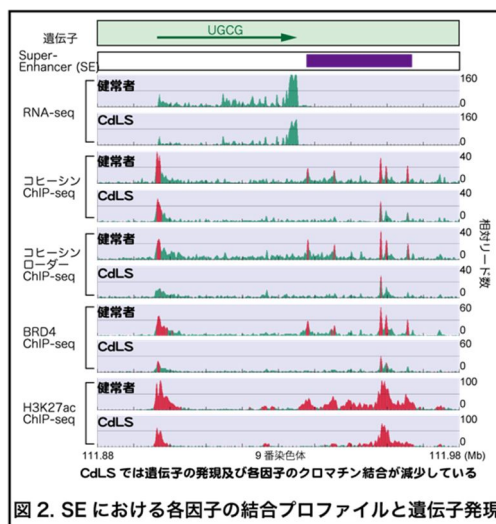


図 2. SE における各因子の結合プロファイルと遺伝子発現

2. 研究の目的

本研究では、SE の形成や維持の制御、さらに SE による転写活性化の過程において、コヒーシン及びコヒーシンローダーがどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。これまでのところ、NIPBL 変異細胞では SE 近傍で遺伝子発現の減少がみられたが、一方で、個々の SE がループ構造によってどの遺伝子と相互作用して発現制御に寄与しているのかは不明であった。そこで、Hi-C 及び HiChIP 解析を取り入れることで SE と各遺伝子とのループ構造を詳細に解析することを目指した。それに加えて、SE では BRD4 をはじめとして、コヒーシンとそのローダーやメディエーターなどの因子が緊密に連携して機能していると予想されることから、これらの因子間の相互関係も明らかにしようと試みた。また、BRD4 と転写のメディエーターである MED1 はタンパク質内の IDR (intrinsically disordered region) と呼ばれる領域を有しており、この IDR は特定のタンパク質が集積して液液相分離を発生させるのに必要であることが知られている。実際に SE 領域を中心とした液液相分離による転写反応の場の形成が提唱されており (Sabari *et al.*, Science, 2018)、NIPBL タンパク質も IDR を有していることから、この相分離を介した SE 形成と制御に寄与している可能性が考えられた。そこで、液

液相分離をはじめとして、NIPBL がどのようなメカニズムで遺伝子発現に寄与するのかを解明しようと試みた。

3. 研究の方法

(1) 染色体上の詳細なループ構造を同定するため、ヒト培養細胞 HCT116 において、エンハンサー-マーカー-H3K27ac とコヒーシサブユニット、RAD21 の HiChIP を行い、クロマチンループ構造の解析を行なった。

(2) より高解像度でループ構造の解析を行うために、ヒト培養細胞 RPE 及び HCT116 において Micro-C 解析を行なった。また、内在のコヒーシサブユニット、RAD21 に Auxin-Inducible Degrader (AID) システムを導入した HCT116 細胞株を用いて、3 時間で速やかにコヒーシを欠損させて細胞で同様に Micro-C 解析を行なった。さらに、健常者及び CdLS 患者由来の線維芽細胞においても Micro-C 解析を行なった。

(3) NIPBL の機能解析のため、NIPBL 全長、N 末端側の相互作用ドメインと IDR を含む断片、相互作用ドメインを欠損した断片、C 末端側の HEAT リピートを含有断片の発現ベクターを構築した。内在性の NIPBL に変異を導入して野生型 NIPBL の発現が低下した 293FT 細胞にこれらの発現ベクターを導入して、BRD4 及び MED1 のクロマチン結合の変化を ChIP-qPCR によって解析した。

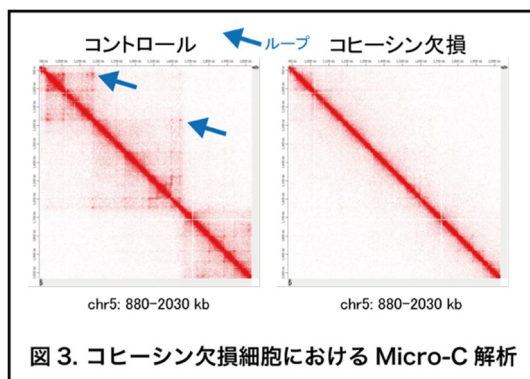
4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

SE による遺伝子発現制御の詳細を調べるため、ヒト培養細胞 HCT116 において、エンハンサー-マーカー-H3K27ac とコヒーシサブユニット、RAD21 の HiChIP を行い、クロマチンループ構造の解析を試みた。これまでに既に HiChIP 法を確立していたが、一方で、得られたデータは解析に使用不可能な PCR バイアスリードペアの割合が約 66% を占めており、実験の効率化が必要であった。そこで、シーケンシング DNA ライブラリ調製を効率化して PCR バイアスを抑制するために、タグメンテーション法の導入を試みたところ、H3K27ac と RAD21 のどちらの HiChIP サンプルについても PCR バイアスリードペアを 1% 程度に抑制し、約 99% のユニークリードペアを得られた。そこで、Hi-C 及び HiChIP のデータ解析を進めていったものの、これらの手法では制限酵素でクロマチンを数 kb に断片化して高次構造を同定ことから、プロモーターとエンハンサーのクロマチンループのような細やかな構造を解析する上では解像度に難があることが明らかとなってきた。

高次構造解析にはこれまでに上述のように Hi-C 法がよく用いられていたが、最近では新たな手法として Micro-C 法が開発されている。Micro-C ではクロマチンの断片化に micrococcal nuclease を用いることで、数百ベース単位の高い解像度で高次構造データが得られることが報告されている。そこで、より高解像度で高次構造を行うために、ヒト培養細胞 RPE において Micro-C 解析を行なった。その結果、Hi-C の 3 倍以上の数のプロモーターとエンハンサー間のループ (E-P ループ) をゲノム全体で同定することができた (Micro-C: 9938 ループ、Hi-C: 3162 ループ)。そこで次に、内在のコヒーシサブユニット、RAD21 に AID システムを導入した HCT116 細胞株を用いて、3 時間で速やかにコヒーシを欠損させて細胞で同様に Micro-C 解析を行なった。コヒーシ存在下のコントロールの細胞で 9010 の E-P ループが得られた一方で、コヒーシ欠損下では 220 の E-P ループしか得られなかったことから、染色体上のほとんどの E-P ループがコヒーシに依存することが明らかとなった (図 3)。

さらに、健常者及び CdLS 患者由来の線維芽細胞においても Micro-C 解析を行なった。まず SE とプロモーターのループ (SE-P ループ) について解析を行ったところ、CdLS での発現上昇遺伝子ではループが形成されている割合が少ない一方で、発現減少遺伝子ではより多くのループが形成されていることが明らかとなった。さらに CdLS では発現減少遺伝子と SE のコンタクトが減少しているのが確認できた (図 4)。ゲノム全体でも同様の傾向が見られ、発現減少遺伝子ではコンタクトが減弱している一方で、発現上昇遺伝子では変化がないか、むしろ強まっているということがわかった。これまでの結果と合わせて考えると、通常の細胞ではコヒーシンローダーによって、SE に BRD4 とコヒーシンがリクルートされ、他のメディエーター複合体等の転写共役因子と共にエンハンサーを活性化しつつ、遺伝子のプロモーターとループ構造を形成していると考えられる。一方で、CdLS においては、コヒーシンローダーが減少することで、SE において BRD4 の局在も減少してエンハン



SE において BRD4 の局在も減少してエンハン

サー活性が低下し、かつコヒーシンの結合が減少してプロモーターとのコンタクトが減弱すると予想される。そこでその結果として、最終的に近傍遺伝子の発現が低下してしまうのではないかと考えられる。

また、NIPBL のより詳細な機能解析のため、N 末端側の相互作用ドメインや IDR を含む種々の NIPBL 断片をヒト培養細胞で発現させる実験系の構築に取り組んだ。NIPBL 全長と3種の NIPBL 断片の発現ベクターが構築し、内在性の NIPBL に変異を導入して発現が低下した 293FT 細胞にこれらのベクターを導入して、BRD4 及び MED1 のクロマチン結合の変化を ChIP-qPCR によって解析した。しかしながら、各断片の間でこれらの因子の結合に変化は見られなかった。そこで、まずこれらの全長及び断片がクロマチンで機能しているかを ChIP-qPCR 等で確かめる必要があると考えられた。また、現在は CMV プロモーターで NIPBL を発現しているが、TRE3G プロモーターなどの薬剤誘導型のプロモーターの方が機能的な NIPBL を発現できる可能性があるため、今後はこれについても検討を行っていく。

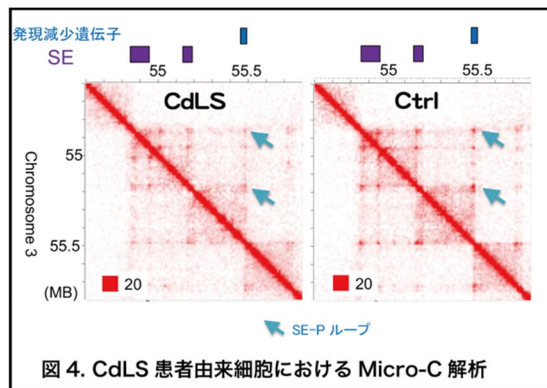


図 4. CdLS 患者由来細胞における Micro-C 解析

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまでにコヒーシン、コヒーシンローダー及びその関連遺伝子の変異によって CdLS が引き起こされることがわかっており、これらの因子を介した染色体高次構造制御と CdLS の発症メカニズムとの関連が考えられていた。本研究の Micro-C 解析により、プロモーターとエンハンサー間のループをゲノムワイドに高解像度で同定し、さらに CdLS におけるループ構造の変化を明らかにした。これらの本研究の成果は CdLS のような発症疾患の発症メカニズムの解明や治療法開発において大いに貢献できると考えられる。また、近年の国際社会では Hi-C 法をはじめとした染色体高次構造解析技術がより一般的になってきている一方で、日本国内ではこのような解析を行うことができるグループは限られているという現状がある。そのような状況の中でも、本研究では、Hi-C、HiChIP 及び Micro-C による染色体高次構造解析を行い、コヒーシンが多くの E-P ループに必須であること、CdLS において一部の遺伝子で E-P ループが減弱していることを見出した。さらに、E-P ループが減弱しているのは発現減少遺伝子であることを明らかにすることで、CdLS における転写制御異常のメカニズムの一端を明らかにすることができた。

(3) 今後の展望

本研究により、コヒーシンが多くの E-P ループに必須であること、CdLS において一部の遺伝子で E-P ループが減弱していることが明らかとなった。コヒーシンがループを形成するメカニズムとしては、コヒーシンが DNA を押し出すようにしてより大きなループを形成するループエクストルージョンモデルが提唱されている。実際にコヒーシンのループエクストルージョン活性は *in vitro* の実験系で報告されており (Kim *et al.*, 2019, Davidson *et al.*, 2019)、この活性にはコヒーシンローダー、ATP 及びコヒーシンの ATPase 活性のいずれも必須であることが示されている。一方で、巨大で複雑なクロマチンである染色体上でのコヒーシンの分子活性については、これまでにほとんど検証されておらず、細胞内の染色体において、コヒーシンが実際にどのような分子メカニズムで転写や高次構造を制御しているのかについての詳細は不明である。そこで今後は、細胞内でコヒーシンが染色体上で転写及び高次構造の制御を行う際にその ATPase 活性はどのように重要であるか、コヒーシンが高次構造の構築を行う上でどのような因子が必須であるかを明らかにしていく必要がある (図 5)。また、NIPBL のより詳細な機能解析のため、NIPBL 全長及び断片の発現系についても検討、解析を行っていく。

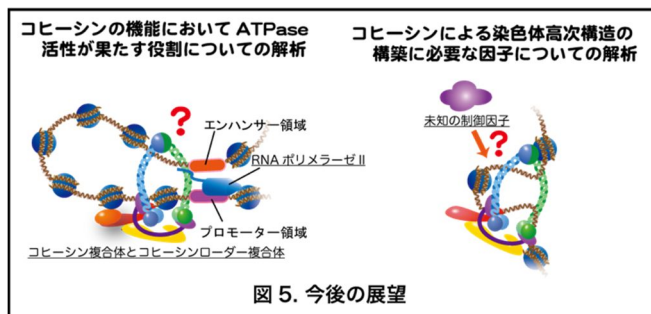


図 5. 今後の展望

Sutani&Sakata *et al.*, Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation, Nature communications, 2015, 6, 7815

Jeppsson *et al.*, The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes, Nat Rev Mol Cell Biol., 2014, Sep;15(9):601-614

Wendt *et al.*, Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor., Nature, 2008, Feb 14;451(7180):796-801

Deardroff *et al.*, HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle, Nature, 2012, Sep 13;489(7415):313-317

Izumi *et al.*, Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin., Nat. Genet., 2015, Apr;47(4):338-344

坂田 & 白髭、コヒーシンによる転写制御と関連疾患、生化学、第 89 巻第 4 号、pp.525-532、2017

坂田 & 白髭、コヒーシン・コンデンシンの欠損を原因とする発生疾患、実験医学、第 36 巻第 17 号、pp.185-191、2018

Sabari *et al.*, Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control., Science, 2018, Jul 27;361(6400).

Kim *et al.*, Human cohesin compacts DNA by loop extrusion, Science, 2019, Dec 13;366(6471):1345-1349

Davidson *et al.*, DNA loop extrusion by human cohesin Science, 2019 Dec 13;366(6471):1338-1345

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂田豊典、坂東優篤、白髭克彦
2. 発表標題 遺伝情報制御ネットワークから見た病態
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂田豊典、泉幸佑、中戸 隆一郎、鄭盛穎、坂東優 篤、白髭克彦
2. 発表標題 CdLS及びCHOPS症候群患者由来細胞を用いたコヒーシンの遺伝子発現制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田豊典、泉幸佑、中戸隆一郎、坂東優篤、白髭克彦
2. 発表標題 コヒーシンローダー遺伝子NIPBL変異細胞における遺伝子発現制御の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------