

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20635

研究課題名(和文) マウス生殖細胞発生過程におけるコヒーシンバリエントの役割の解明とその機能解析

研究課題名(英文) Deciphering the roles of cohesin variants during mouse germline development

研究代表者

長野 眞大 (Nagano, Masahiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00910663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：コヒーシン複合体はクロマチン立体構造を介して遺伝子発現を制御するため、コヒーシン複合体によるクロマチン立体構造制御の正確な理解は生物学における重大な課題である。本研究では、体細胞型コヒーシン複合体の2つの変異体であるSA1-cohesinとSA2-cohesinに着目し、これらがどのように生殖細胞分化を制御するかを解析した。細胞系譜の運命決定の直前の状態であるエピブラスト様細胞においてSA2-cohesinの発現量が上昇し、エンハンサーに濃縮する様子が観察された。ノックアウト細胞株の解析においてもSA2-cohesinは生殖細胞運命決定において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コヒーシン複合体は遺伝子の働きを制御するためにクロマチンの形を整える役割を果たしています。本研究成果は生理学的な細胞分化という文脈において、クロマチンの構造がどのように変化していくかを解明するかを目的にしました。その結果、細胞分化の直前にはSA2-cohesinの量が増え、特定の場所で活発に働くことを発見しました。また、SA2-cohesinが欠損した細胞を調べた結果、生殖細胞への運命決定においてSA2-cohesinが重要な役割を果たすことが明らかになりました。これらの研究結果は、再生医療を含む細胞分化を必要とする分野において重要な知見となります。

研究成果の概要(英文)：The accurate understanding of chromatin architecture regulation by the cohesin complex is a critical challenge in biology, as the cohesin complex controls gene expression through chromatin structural organization. In this study, we focused on two variants of the somatic cohesin complex, SA1-cohesin and SA2-cohesin, and analyzed how they regulate germ cell differentiation. We observed an increased expression of SA2-cohesin and its enrichment at enhancers in the epiblast-like cells, which represent the state just before cell lineage determination. Further analysis using knockout cell lines revealed the crucial role of SA2-cohesin in determining germ cell fate.

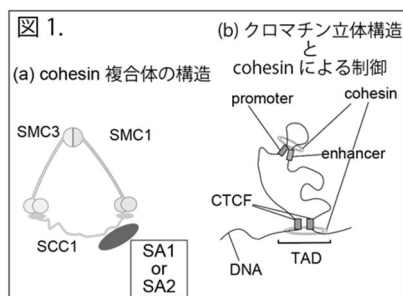
研究分野：細胞分化

キーワード：コヒーシン複合体 細胞分化 生殖細胞 クロマチン高次構造 auxin-inducible degron

1. 研究開始当初の背景

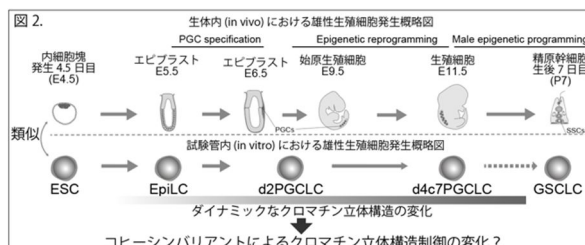
(1) cohesin 複合体によるクロマチン立体構造制御

クロマチン立体構造は遺伝子発現の上位にある制御機構であり、細胞活動に重要である。中でもコヒーシン複合体はクロマチン立体構造を制御する重要なタンパク質であるため、コヒーシン複合体によるクロマチン立体構造制御の正確な理解は生物学における重大な課題である。コヒーシン複合体は4つの主構成要素がある。SCC1, SMC1, SMC3は共通の主構成要素であり、SAタンパク質にはSA1とSA2の2種類が存在する(以下、SA1-cohesin, SA2-cohesin) (図1a)。コヒーシン複合体はこのリング構造の中にDNAを内包することでクロマチン立体構造を形成する(図1b)。このリング構造によりプロモーターとエンハンサーは空間的に近接することが知られている(図1b) (Kagey M et al., Nature, 2010)。また、コヒーシン複合体は、CTCFと結合し安定化させることで立体的なドメイン (topologically associated domains; TADs)を形成し、エンハンサーの及ぶ領域を区切ることも知られており(Wendt K et al., Nature, 2008; Dixon JR et al., Nature, 2012)、クロマチン立体構造制御において様々な役割を担う(図1b)。近年、SA1-cohesinとSA2-cohesinが異なる方法でクロマチン立体構造を制御することが癌細胞、胚性幹細胞において報告された(Cuadrado A et al., Cell Reports, 2019; Kojic A et al., Nature Structural and Molecular Biology, 2018)。しかし、生理学的な細胞分化過程におけるSA1-cohesin, SA2-cohesinの機能に関しては未解明である。



(2) 生殖細胞試験管内再構成系とエピゲノム変化

所属研究室ではこれまで生殖細胞試験管内再構成系に関して研究を進め、他の追従を許していない。胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells; ESCs)を起点とし、エピブラスト様細胞 (Epiblast-like Cells; EpiLCs)より始原生殖細胞様細胞(Primordial Germ-cell like Cells; PGCLCs)を経て、精原幹細胞様細胞 (Germline Stem Cell-like Cells; GSCLCs)を分化させることに成功しており、この細胞は精子形成に寄与することがこれまでに示されている(図2) (Ohta H et al., Biology of reproduction, 2021; Ohta H et al., EMBO journal, 2017; Ishikura Y et al., Cell Reports, 2016; Hayashi K et al., Cell, 2011)。この試験管内再構成系により誘導される細胞は生体内の細胞と転写状態、エピゲノム状態ともに類似していることも示されており、生理学的な状態に非常に近いと考えられる。申請者はこれまで生殖細胞発生過程においてはH3K9(ヒストンH3、9番目リジン)のメチル化のダイナミックなエピゲノム変化が起こり、それに伴いクロマチン立体構造が大きく変化することを見出してきた(Nagano M et al., EMBO journal, 2022)。劇的にクロマチン立体構造が変化する生殖細胞分化過程はコヒーシン複合体によるクロマチン立体構造制御機構を解明するために非常に有用であると考えられる。



2. 研究の目的

本研究の目的は、生殖細胞試験管内再構成系を用い、コヒーシンバリエーション(SA1-cohesin, SA2-cohesin)が行うクロマチン立体構造制御機構を解明し、生殖細胞分化過程におけるそれらの機能を解析することである。本研究において、遺伝子発現を上流で制御するメカニズムであるクロマチン立体構造とエピゲノムを包括的に、かつ生殖細胞分化過程を通じて解析することにより、普遍的なクロマチン立体構造制御のより精細な理解、さらには一部の白血病をはじめとしたコヒーシン異常による多くの疾患機序の解明にもつながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) SA1-cohesin, SA2-cohesin の各細胞種における定量化ならびに結合部位の同定

SA1-cohesin, SA2-cohesinがESCs, EpiLCs, d4c7PGCLCs, GSCLCsでどの程度存在するかを調べるために、共通の構成要素であるSCC1とともに、SA1, SA2をウエスタンブロットで解析する。またChIP-seq法を用いて各細胞種におけるSA1-cohesin, SA2-cohesinのゲノム上の結合部位を網羅的に解析する。

(2) SA1-cohesin, SA2-cohesin の結合部位におけるエピゲノム的特徴の探索

ChIP-seq法で同定されたSA1-cohesin, SA2-cohesinの結合部位の特徴を15種類以上の豊富なエピゲノムデータを用いて解析することでSA1-cohesin, SA2-cohesinが持つ生物学的な意義を

考察する。

(3) 各細胞における立体的なクロマチン相互部位の同定

これまでの研究で申請者はHi-C法による全ゲノム的なクロマチンの立体構造解析を行ってきたが、本研究では特定のタンパク質により介在される立体的なコンタクトを濃縮して解析するHiCHIP法を用いる(Mumbach MR et al., Nature Methods, 2016)。SA1-cohesin, SA2-cohesinによるクロマチン立体構造を直に解析することで、SA1, SA2の介在するクロマチン立体構造の違いをより明確にすることが出来ると考えられた。

(4) auxin-inducible degron (AID) によるタンパク質分解系実験と表現型解析

コヒーシン複合体は細胞分裂期に重要な役割をするため、ノックアウトによる表現型の解析が非常に困難なことがある。そのため本研究では、近年報告されたAID系を用いる(Yesbolatova A et al., Nature Communications, 2020)。AID系は細胞毒性のほとんどない低濃度薬剤の添加により2時間以内に目標タンパク質を速やかに分解する系であり、従来ではノックアウトの解析が出来なかった遺伝子のタンパク質分解による表現型の解析が可能となる。生殖細胞分化過程において、SA1, SA2を消失させた時の細胞分化誘導効率、表現型を解析すると同時に、mRNA、エピゲノム、クロマチン立体構造を、RNA-seq法, ChIP-seq法, Hi-C法により解析することで、それぞれのコヒーシンバリエーションの役割をより明確にすることが出来る。

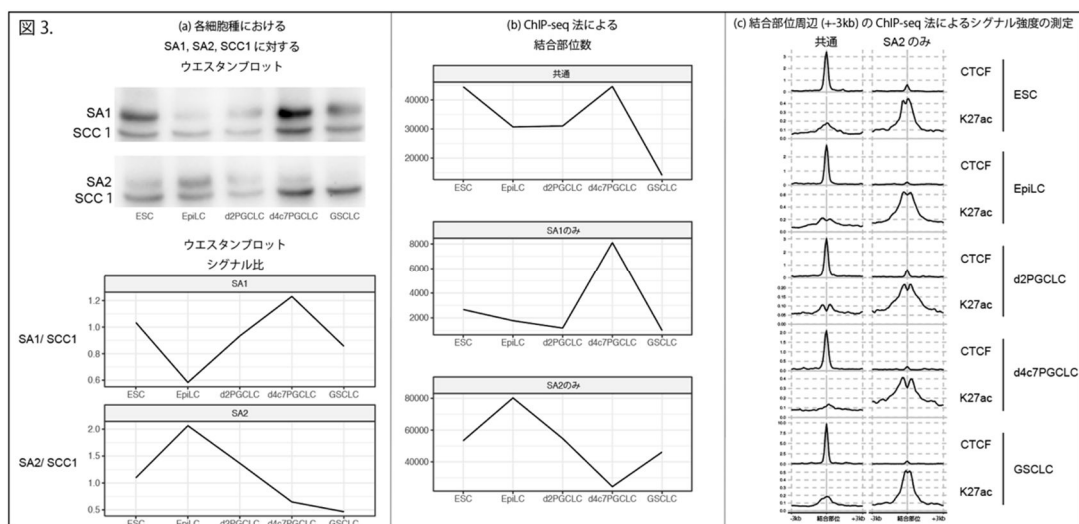
(5) CRISPR-Cas9 システムを用いたノックアウト細胞株の解析による SA1-cohesin, SA2-cohesin の生理学的機能の同定

CRISPR-Cas9を用いてSA1, SA2のノックアウト細胞株を作成し、それぞれのタンパク質が生殖細胞分化誘導においてどのような重要な役割を果たすかを単一細胞RNA-seqを用いて解析する。さらに、後期始原生殖細胞様細胞への分化も行い、SA1, SA2の役割を解析する。

4. 研究成果

(1)に関してはEpiLCsやd2PGCLCsではSA2-cohesinが比較的多く存在する一方で、ESCs, d4c7PGCLCsではSA1-cohesinが多く存在していることが示唆された(図3a)。次にChIP-seq法を用いてコヒーシンの結合部位を同定した。ESCs, d4c7PGCLCsではSA1-cohesinとSA2-cohesinの共通の結合部位が多く同定される一方で、EpiLCsではSA2-cohesinの結合部位が多く同定された(図3b)。

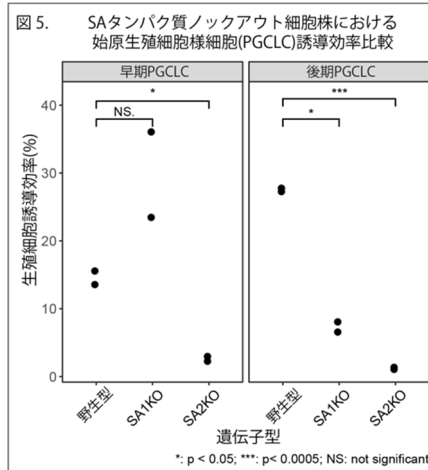
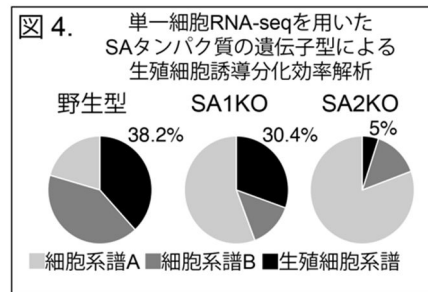
(2)に関しても、博士課程中の研究で取得した15種類を超える豊富なエピゲノムデータとの関連を解析している。どの細胞種においてもSA1-cohesin, SA2-cohesin共通の結合部位が立体構造的な区切りに関わるCTCFの結合部位に濃縮する一方、SA2がよりH3K27ac(ヒストンH3、27番目リジンのアセチル化修飾)に代表されるエンハンサー、プロモーターの領域に濃縮することが明らかになり、SA2-cohesinがより密接に転写に関わる可能性を支持した(図3c)。



(3)に関しては、予備実験段階ではH3K27acに着目し、エンハンサーを中心とする空間的相互作用の濃縮に成功した。しかし、百万細胞スケールの実験では、SA1, SA2を中心とした相互作用を検出するには、相互作用の頻度、もしくは抗体の親和性が不十分であったためか、十分解析に足るデータが得られなかった。

(4)に関しては、予備実験段階ではCTCFにAIDのタグ付けを行い、分解効率を確認したところ1時間以内に迅速なタンパク質の分解が確認された。そこで、目的であるSA2のC末端に対してタグ付けを行ったところ、ノックイン自体はうまく行くもののOSTIR1のリークによると考えられる分解により、非分解時にも著明にタンパク質レベルの減少が観察された。

(5)に関しては、SA1 ノックアウトならびに SA2 ノックアウト胚性幹細胞を作成した。SA1 ノックアウトならびに SA2 ノックアウトの表現型の解析を重点的に行った。まず、scRNA-seq を行い、どのように lineage が分化してくかの違いを解析した。すると、SA2 では生殖細胞分化効率が低下する一方で、SA1 ノックアウトでは生殖細胞分化効率が増加することが明らかになった。面白いことに、他の系譜への細胞分化は野生型と同様に起こることも明らかになった(図 4)。さらに、後期始原生殖細胞様細胞の段階まで誘導することで、SA1 ノックアウトならびに SA2 ノックアウトが異なる時期における誘導に重要であることが示された(図 5)また SA1 ノックアウト、SA2 ノックアウトの胚性幹細胞を用いて Hi-C を行い、クロマチン高次構造の変化を解析し、SA1 では CTCF のインスレーションが強固になっていることも観察された。今後は、エンハンサープロモーター相互作用に着目したより高解像度の解析を行うことで、SA1-cohesin, SA2-cohesin のコヒーシンバリエントが担う細胞分化におけるクロマチン立体構造制御の解明を目指したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagano Masahiro, Hu Bo, Yokobayashi Shihori, ..., Saitou Mitinori	4. 巻 41
2. 論文標題 Nucleome programming is required for the foundation of totipotency in mammalian germline development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2022110600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nagano M, Hu B, Yokobayashi S, Saitou M.
2. 発表標題 Nucleome programming is required for the foundation of totipotency in mammalian germline development
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagano M
2. 発表標題 Nucleome programming for mammalian germ cell development.
3. 学会等名 EMBO Japan Virtual Lectures, Molecular basis of epigenetic inheritance and totipotency (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagano M
2. 発表標題 Mitotic cohesin with Stag3 attenuates insulation in mouse spermatogonia.
3. 学会等名 EMBO workshop, Nuclear structure and dynamics (国際学会)
4. 発表年 2022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1件

国際研究集会 EMBO workshop	開催年 2022年～2022年
-------------------------	--------------------

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			
オーストリア	IMP			