

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14673

研究課題名(和文) 染色体高次構造の形成におけるコヒーシンの制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Cohesin regulation in organization of 3D genome structures

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)：コヒーシン複合体とそのローダーによる転写制御については不明な点が多いことから、本研究ではローダーのNIPBL遺伝子に変異を有するヒト培養細胞株を用いて、ChIP-seq、RNA-seqとHi-Cによる網羅的な解析を行った。その結果、super-enhancer (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いた。さらに、BRD4やメディエーター複合体といった転写コファクターも結合の減少がみられたことから、コヒーシンやそのローダーはこれらの因子と協調して、発生関連遺伝子群の転写活性化に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、コヒーシン複合体とそのローダーはBRD4やメディエーター複合体といった転写のコファクターと協調して、スーパーエンハンサー近傍の発生関連遺伝子群の発現を促進していることが示唆された。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やBRD4遺伝子の変異によってCornelia de Lange Syndrome (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 mis-regulation of genes mediated by cohesin and its loader, how these factors regulate transcription remains to be unclear. To approach this point, we performed ChIP-seq, RNA-seq and Hi-C analysis using CdLS patient cell and culture cell lines with mutations in NIPBL gene. We detected differentially expressed genes (DEGs) in these cells and these DEGs were related to the developmental cell process. Moreover, we found down-DEGs were located near super-enhancers (SEs) and chromatin binding of cohesin and cohesin loader was reduced at SEs and chromatin binding of transcriptional co-factors, BRD4 and MED1 was also reduced. Taken together, we currently speculate reduction of these factors at SEs could result in weakened enhancer activity and finally induces reduced expression of nearby genes related to the developmental cell process.

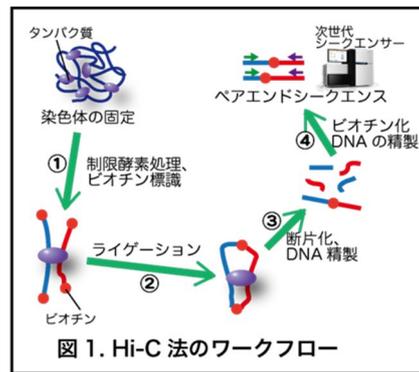
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：コヒーシン コヒーシンローダー スーパーエンハンサー CdLS BRD4

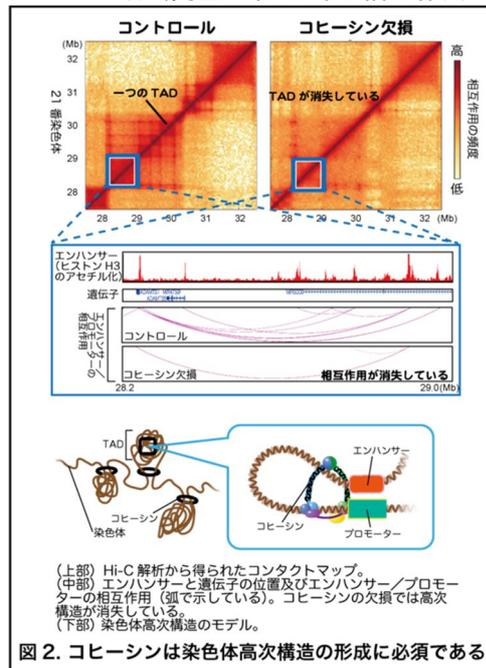
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体高次構造は種々の染色体機能において重要な役割を果たすことが知られている。特に遺伝子の転写と関わりのある構造単位としては、Topologically Associating Domain (TAD) が挙げられる。TAD は一定の領域内でクロマチン相互作用が多い領域で、TAD 内外での転写制御効果を物理的に遮断していると考えられている。また、その TAD 内において、個々の遺伝子についてプロモーターとエンハンサーが相互作用する下層構造が存在し、転写制御に寄与している。このような高次構造の形成に関わる因子としては、コヒーシン複合体とコヒーシンを染色体上へリクルートするローダーである NIPBL/MAU2 複合体が注目されている。コヒーシンは RAD21 をはじめとする 4 つの主要なサブ



ユニットで構成されており、DNA 複製後の姉妹染色分体間の接着に加えて、転写制御にも関わることが知られている。申請者らのグループもこれまでにコヒーシンが、1) CCCTC-binding factor (CTCF) とともに転写のインシュレーターとして機能すること、2) Super Elongation Complex (SEC) と相互作用して転写の制御に関わることを報告した (Wendt *et al.*, Nature, 2008, Izumi *et al.*, Nat. Genet., 2015)。転写は RNA polymerase II (RNAPII) のローディングから、開始前、開始、伸長というように多段階的に制御されていることが知られており、SEC はこの伸長段階を促進する因子である。このような機能に加えて、コヒーシンが TAD の境界、エンハンサー、プロモーターに局在することも明らかにされたことから、申請者らはコヒーシンと高次構造の関わりについて、Hi-C 法を用いて検証した。Hi-C は Chromosome Conformation Capture (3C) 技術と次世代シーケンシング技術を合わせることで、クロマチン領域同士の物理的な相互作用を網羅的に同定する手法である (図 1)。その結果、コヒーシンの欠損で TAD やエンハンサー/プロモーター相互作用の大部分が失われたことから、コヒーシンがこれらの高次構造形成に必須であることが示された (図 2)。また、コヒーシンとそのローダーのハプロ遺伝子変異は Cornelia de Lange Syndrome (CdLS) の原因となっており、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。これまでの研究で CdLS では患者細胞において姉妹染色分体間接着の異常はみられないことから、CdLS はコヒーシンによる転写制御の異常によって引き起こされると考えられている。さらに、SEC のコアサブユニットの一つである AFF4 の変異も CdLS と非常に類似した症状が見られる CHOPS 症候群の原因となることが知られている。これらの疾患は何らかの共通の分子メカニズムによって引き起こされると予想されるが、その詳細についてはこれまでに不明であった。そこで、高次構造形成におけるコヒーシンとそのローダーの制御や、これらの因子による転写制御について、その分子機構を詳細に明らかにしていく必要があった。



2. 研究の目的

本研究では、染色体高次構造形成におけるコヒーシンとそのローダーの制御及び、これらの因子による転写制御についてのメカニズムを明らかにすることを目的とした。これまでのところ、コヒーシンと CTCF が染色体高次構造形成の中心となる因子として注目されており、TAD がコヒーシンと CTCF によって協調的に形成されることが明らかとなってきた。一方で、染色体高次構造と転写との関わりについては、一部の遺伝子で転写のメディエーター複合体が関与することが報告されていたが、この過程でのコヒーシンとローダーの制御についての詳細な分子メカニズムまではわかっていなかった。さらに、高次構造と転写制御の関わりについての全体像は不明な点が多かった。そこで本研究では、CdLS と CHOPS 症候群患者由来細胞をモデルとして、染色体高次構造の解析及び、コヒーシンとそのローダーによる転写制御についての解析を行った。さらに、高次構造形成と転写制御の過程において、コヒーシンやコヒーシンローダーとともに協調的に機能する因子を探索した。これらの解析によって、コヒーシンとコヒーシンローダーによる高次構造形成と転写制御を統合的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 染色体高次構造及び転写制御におけるコヒーシンとそのローダーの機能を明らかにするため、コヒーシンローダー NIPBL 遺伝子に変異を有する CdLS 患者由来の線維芽細胞と、同遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

に変異導入したヒト培養細胞 293FT 株及び、AFF4 遺伝子に変異を有する CHOPS 症候群患者由来の線維芽細胞を用いて、ChIP-seq、RNA-seq、Hi-C の網羅的な解析を行った。また、ChIP-seq についてはスパイクインノーマライゼーション法を用いることでより定量的なタンパク質結合プロファイルを得た。実際の実験としては ChIP の免疫沈降前にマウス C2C12 細胞をヒト細胞の 5 分の 1 程度加えることでスパイクインを行った。解析の段階では、ヒトとマウスゲノムの両方に ChIP-seq データのマッピングを行い、マウスゲノムにマッピングされたリード数に応じて、ヒトゲノムにおける ChIP-seq リード数の正規化を行った。

(2) コヒーシンローダーと BRD4 及びメディエーターの相互関係を調べるため、ヒト培養細胞株 HCT116 において、BRD4 のクロマチン結合を阻害する薬剤 dBET6 処理、またはメディエーター複合体のサブユニットの一つである MED1 の RNAi 処理の条件下で ChIP-seq と ChIP-qPCR 解析を行った。

(3) コヒーシン及びそのローダーとともに染色体高次構造を制御する因子を探索するため、転写開始前複合体のサブユニット、TBP、TAF1、TAF6、さらにメディエーター複合体のサブユニット、MED1、MED12、MED23、MED26 RNAi 処理の条件下で Hi-C を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

CHOPS 患者由来の線維芽細胞を用いて、ChIP-seq 解析を行ったところ、患者細胞では AFF4 のクロマチン結合量の増加が塩基配列レベルの高解像度で確認できた。さらに、コヒーシンローダーの ChIP-seq 解析から、CHOPS 患者細胞では CdLS 患者細胞と同様にコヒーシンローダー複合体の両サブユニットである NIPBL と MAU2 のクロマチン結合が減少していることがわかった。

これまでに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きており、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。そこで、CdLS と CHOPS の両患者細胞において、解析を行ったところ、SE においてコヒーシンとそのローダー及び MED1 のクロマチン結合が減少しており、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、両患者細胞ではこの BRD4 の減少もみられた (図 3)。一方で、CHOPS 患者細胞では SE においても AFF4 の増加がみられた。さらに両患者細胞において、RNA-seq 解析を行ったところ、以前の報告と一致して、これらの患者細胞における発現変動遺伝子の転写プロファイルには正の相関が見られた。また、発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes, DEGs) には発生関連遺伝子群が有意に含まれており、さらに、ChIP-seq データを合わせて解析を行ったところ、有意に発現減少がみられる遺伝子群は SE 近傍に局在していることがわかった。

また、NIPBL 遺伝子に変異導入した 293FT ヒト培養細胞株において、同様に ChIP-seq 及び RNA-seq 解析を行ったところ、CdLS 患者細胞と類似して BRD4 と MED1 のクロマチン結合の減少及び、発生関連遺伝子群の発現変動が確認できた。以上の結果から、コヒーシンとそのローダーは SE において SE の活性化に寄与しており、その周辺の発生関連遺伝子群の発現を促進していることが示唆された。また、CHOPS 患者細胞では、CdLS と同様にコヒーシンローダーのクロマチン結合の減少とそれに伴う BRD4 や MED1 のクロマチン結合の減少が見られたことから、CdLS と類似の転写異常が引き起こされていると考えられる。

次に、コヒーシンローダーと BRD4 及びメディエーターの相互関係を調べるため、ヒト培養細胞株 HCT116 において、BRD4 のクロマチン結合を阻害する薬剤である dBET6 処理及び、MED1 RNAi

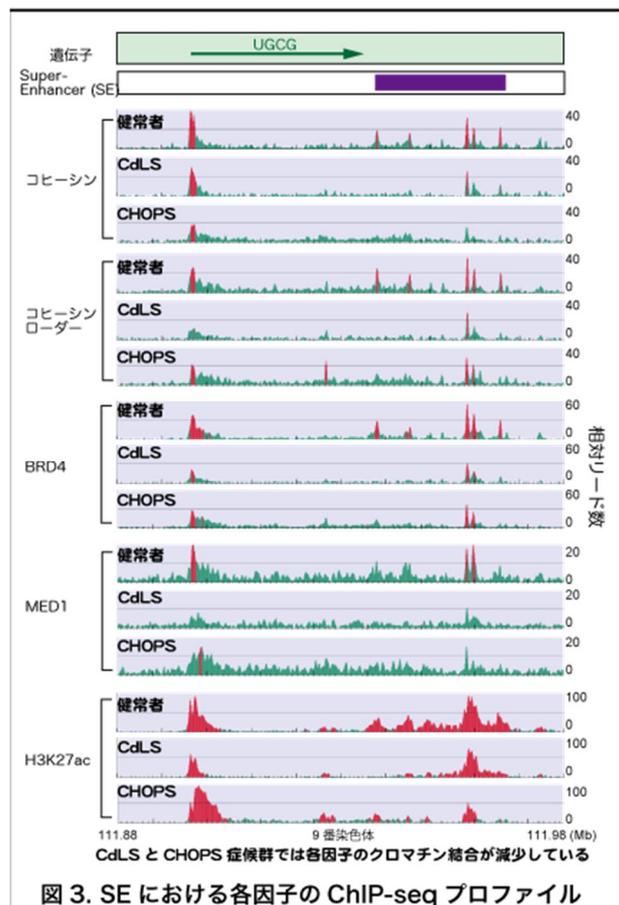


図 3. SE における各因子の ChIP-seq プロファイル

処理で MED1 を欠損させた条件で、コヒーシンローダーのクロマチンへの結合を ChIP-seq と ChIP-qPCR で解析した。その結果、どちらの条件でもローダーに大きな変化はみられなかったことから、コヒーシンやそのローダーはこれらの因子の上流で転写制御に寄与していることが示唆された。

さらに、染色体高次構造への影響を調べるために CdLS と CHOPS の両患者細胞において Hi-C 解析を行った。その結果、どちらの患者細胞においても 100 キロベース以下の比較的近距離のクロマチン相互作用の増加が見られたものの、顕著なコンパートメント構造の変化や TAD 境界の変化はみられなかった。一方で、CdLS と CHOPS の両患者細胞では、健常者の細胞で見られるクロマチンループに加えて、異所的なループが新たに形成されていることがわかった。さらに、このうち CdLS 特有のループの近傍には通常の遺伝子と比較して、発現上昇の DEGs が局在していた。これらの結果から、コヒーシンローダーは遺伝子発現に関わる細やかなクロマチンループの制御に寄与していることが示唆された。

また、コヒーシン及びそのローダーとともに染色体高次構造を制御する因子を探索するため、既知の転写制御因子の欠損下で Hi-C 解析を行った。具体的には、転写開始前複合体のサブユニット、TBP、TAF1、TAF6、さらにメディエーター複合体のサブユニット、MED1、MED12、MED23、MED26 について、RNAi を用いてノックダウンした細胞を使って実験を行った。その結果、メディエーター複合体サブユニットの欠損では、コヒーシンの欠損と同様にエンハンサー/プロモーター相互作用の減少がみられた。反対に、転写開始前複合体サブユニットの欠損ではエンハンサー/プロモーター相互作用は増加していた。従って、これらの因子はコヒーシンとともに染色体高次構造の制御に寄与している可能性があり、今後はさらなる解析が必要である。

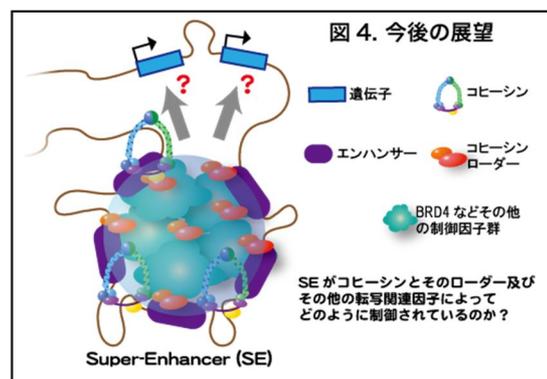
(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

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、興味深いことに、最近では BRD4 遺伝子の変異も CdLS の原因となることが報告された (Olley *et al.*, Nat. Genet., 2018)。また、AFF4 の変異によって引き起こされる発生疾患である CHOPS 症候群の患者は CdLS 患者と非常に類似した症状を示す。本研究により、コヒーシン複合体とそのローダーは BRD4 やメディエーター複合体といった転写のコファクターと協調して、スーパーエンハンサー近傍の発生関連遺伝子群の発現を促進していることが示唆された。さらに、CHOPS 症候群の患者細胞ではコヒーシンローダーのクロマチン結合が減少していることが明らかとなった。これらの本研究の成果は CdLS や CHOPS 症候群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。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 による染色体高次構造解析を行い、CdLS と CHOPS の両患者細胞で異所的なクロマチンループが新たに形成されており、CdLS 特有のループの近傍には発現上昇の DEGs が局在していることを見出した。さらに、培養細胞株での Hi-C 解析によって転写開始前複合体のサブユニットやメディエーター複合体のサブユニットが染色体構造制御に寄与していることを明らかにした。これらの解析により、コヒーシンとその関連因子による高次構造の制御と転写制御の連携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、CHOPS 細胞でコヒーシンローダーのクロマチン結合が減少していることが明らかとなったが、その詳しいメカニズムは不明である。CHOPS 細胞では SEC が過剰に活性化していると考えられることから、SEC のキナーゼモジュールである P-TEFb によるリン酸化がローダーの結合制御に関わっている可能性がある。そこで今後は培養細胞株において、AFF4 や P-TEFb の過剰発現やノックダウン及び阻害剤処理した条件下でコヒーシンローダーのクロマチン結合変化等を解析することで詳細な分子メカニズムを明らかにしていく必要がある。

また、コヒーシンとコヒーシンローダーは SE においてその活性化に寄与しており、SE 周辺の発生関連遺伝子群の発現を促進していることが示唆された。一方で、コヒーシンとそのローダーが 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る。最近では、BRD4 と MED1 等の特定のタンパク質が集積することで SE 領域を中心として液液相分離が起こり、転写反応の場が形成されるというモデルが提唱されている (Sabari *et al.*, Science, 2018)。液液相分離には、タンパク質内の IDR (intrinsically disordered region) が重要



様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

であることが示されており、BRD4 と MED1 に加えて、NIPBL と AFF4 タンパク質も長大な 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る(図 4)。そこで今後は、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、コヒージンとローダーや SEC がどのような役割を担っているのか、また、液 液相分離をはじめとしてそれがどのようなメカニズムで成り立っているのかを明らかにしていく必要があると考えている。

<参考文献>

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

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):338-44

Olley *et al.*, BRD4 interacts with NIPBL and BRD4 is mutated in a Cornelia de Lange-like syndrome., Nat. Genet., 2018, Mar;50(3):329-332

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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Toyonori Sakata
2. 発表標題 Organization of 3D genome structure in Cornelia de Lange syndrome (CdLS)
3. 学会等名 Cornelia de Lange Syndrome Foundation Scientific & Educational Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toyonori Sakata
2. 発表標題 Organization of 3D genome structure in Cornelia de Lange syndrome (CdLS)
3. 学会等名 3R3C symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田豊典
2. 発表標題 コルネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS) 患者由来細胞における染色体高次構造の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toyonori Sakata
2. 発表標題 Analysis of transcription and 3D genome structure in Cornelia de Lange syndrome (CdLS)
3. 学会等名 EMBO workshop Vienna 2019 - Organization of bacterial and eukaryotic genomes by SMC complexes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田豊典
2. 発表標題 Genome-wide Analysis in Cohesin-related Syndromes
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田豊典
2. 発表標題 コルネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS) 患者由来細胞における遺伝子発現制御の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田豊典
2. 発表標題 コルネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS) 患者由来細胞における遺伝子発現制御の解析
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----