

転写制御装置としてのコヒーシン：希少疾患からのアプローチ

定量研 白髭克彦
イルミナ ウェビナー
03312021

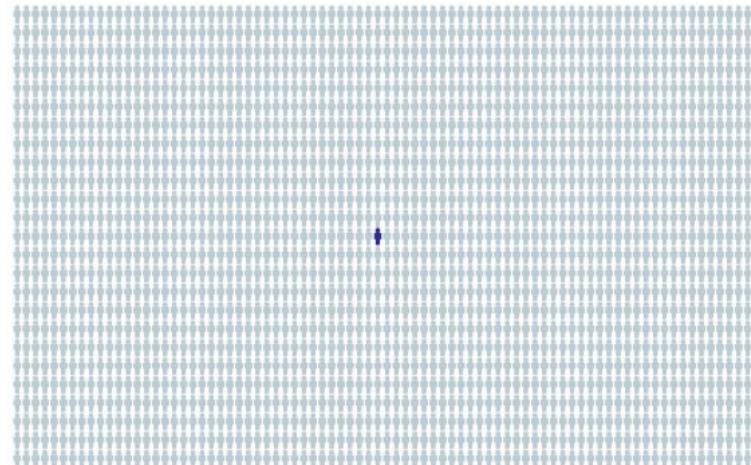
希少疾患とは？

- 人口の極僅かな人たちが罹患する病
- ただし、明確な基準はない

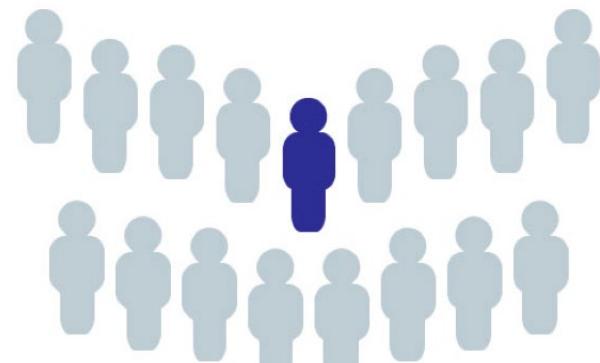
希少疾患はどの程度存在するのか？

- ・日本: 50,000 人以下の患者数あるいは2,500人に一人の割合
- ・ヨーロッパの希少疾患学会によると 5,000 から 7,000 個の希少疾患が存在
- ・これを累積すると全人口の6% から 8% が希少疾患に罹患している

Each rare disease



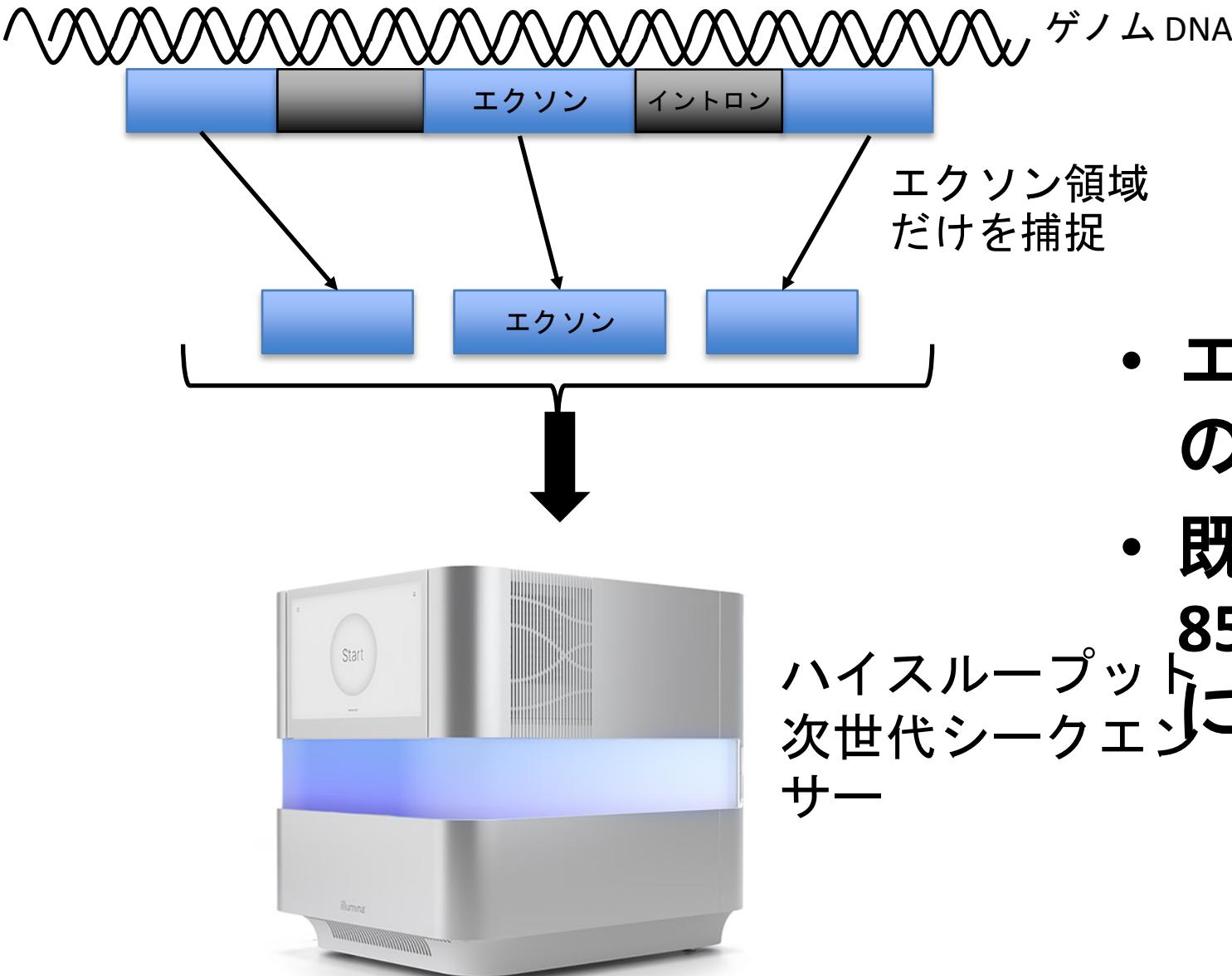
But, collectively,



希少疾患の研究が困難な理由

- 疾患自体とても稀
- 遺伝疾患であることが強く疑われても、その本質（遺伝子変異）を同定し、理解することは極めて困難
- ただし、エクソーム解析によりその本質の理解への第一歩を踏み出すことが可能になっている！

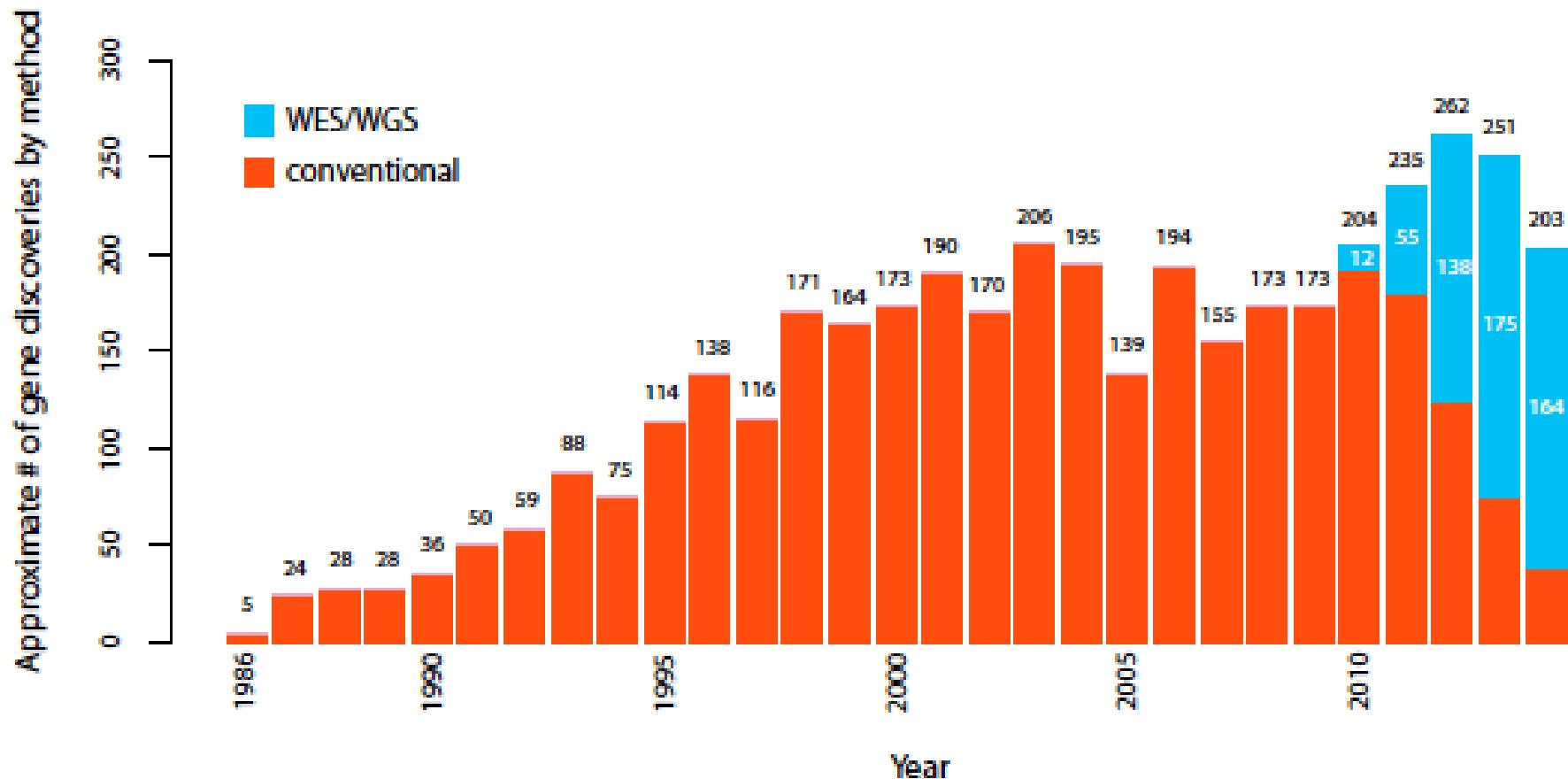
エクソン解析



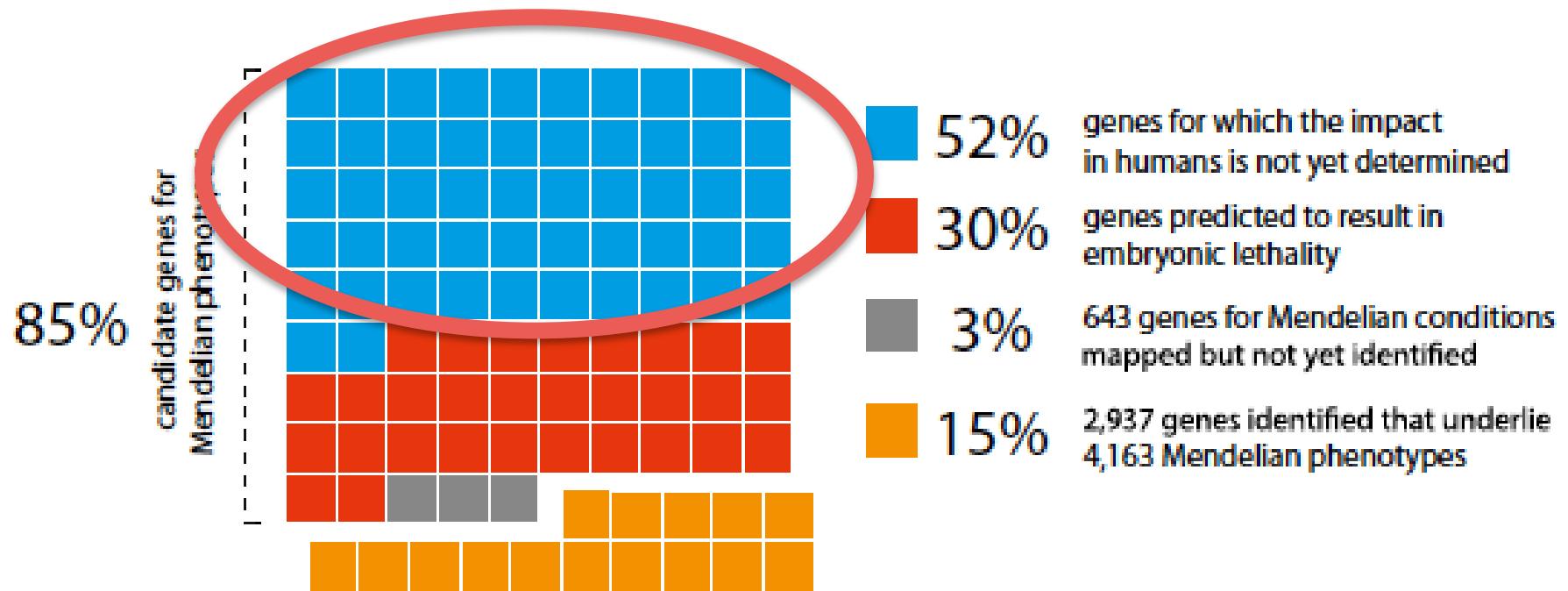
- エクソン:ゲノムの1%
- 既知の疾患の85%はエクソンに変異を持つ

ハイスクループット
次世代シーケンサー

希少疾患原因遺伝子の発見

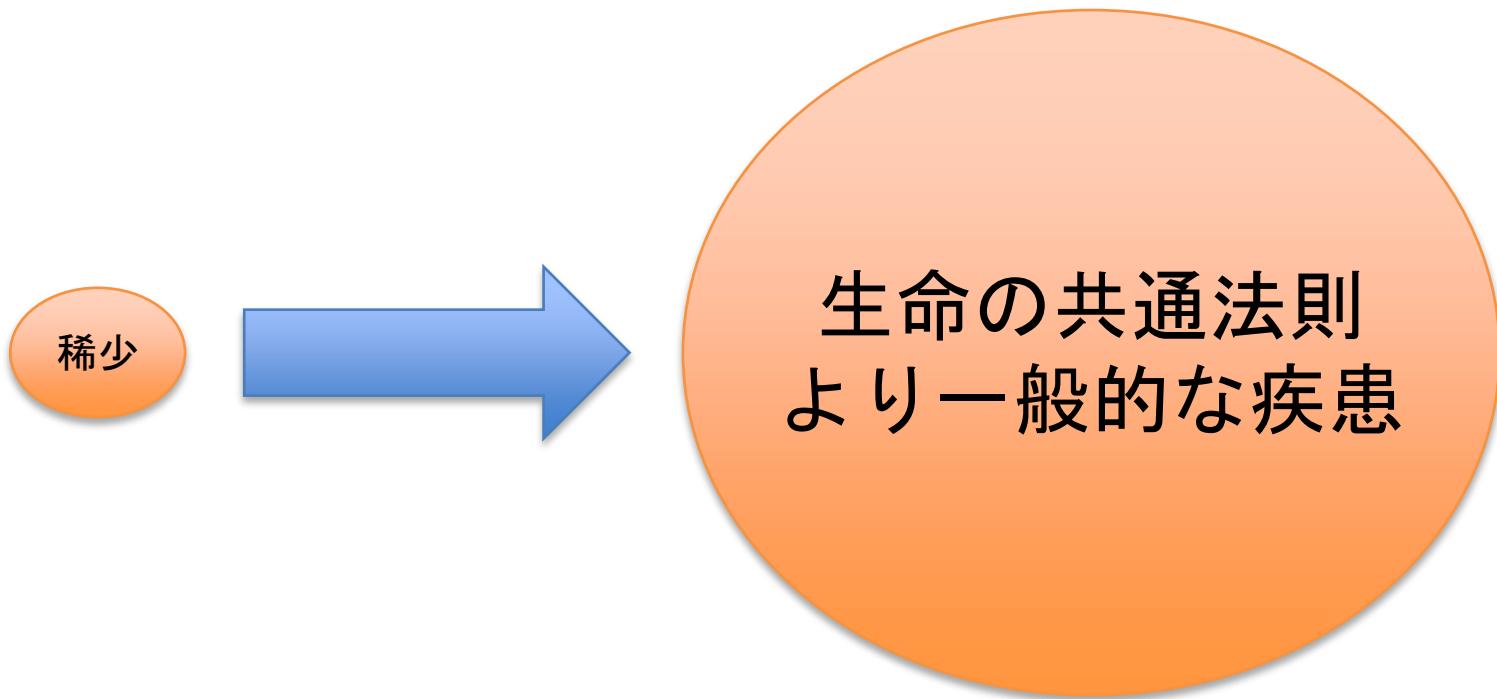


タンパクをコードする遺伝子と疾患の関係

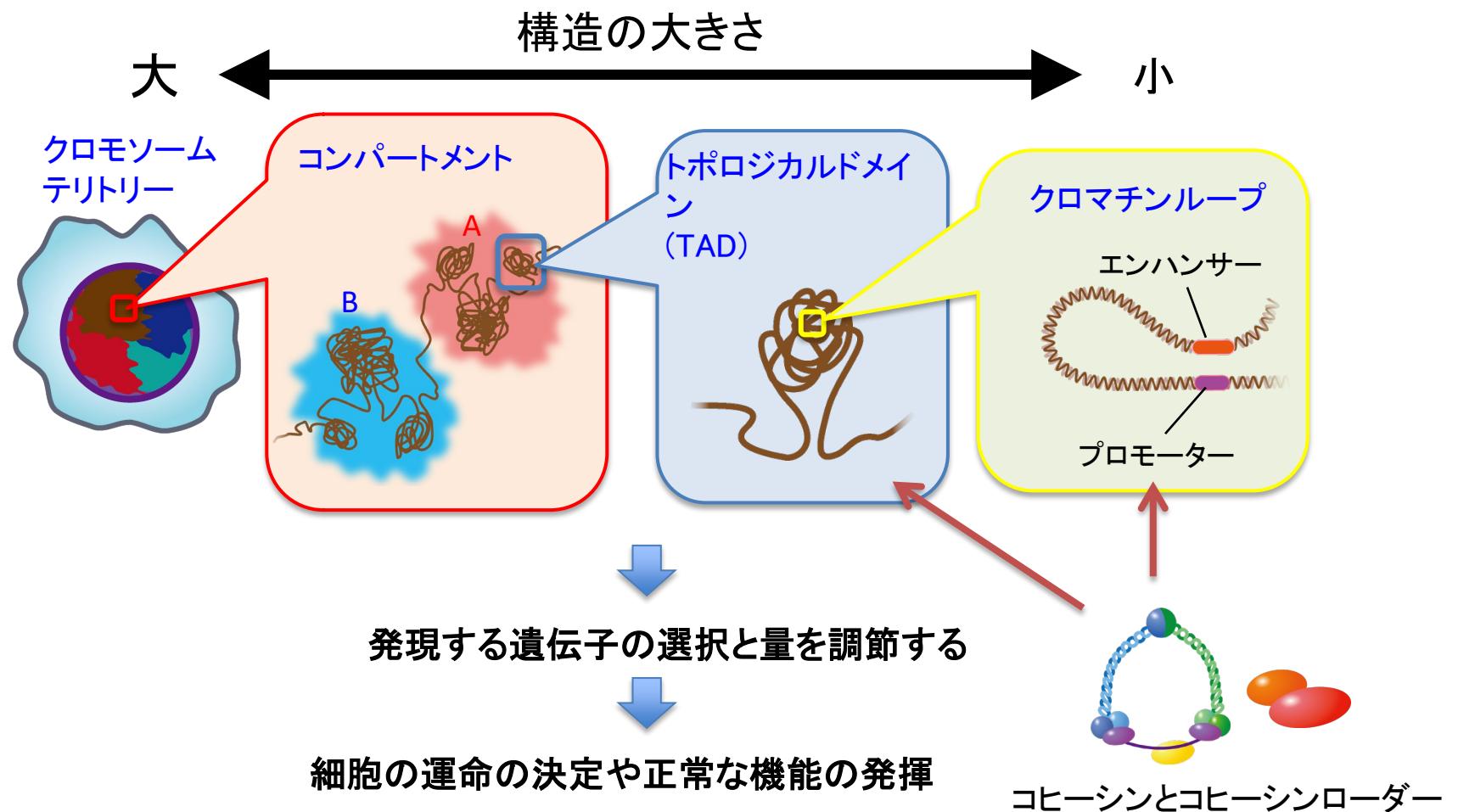


まだまだやるべきことはある

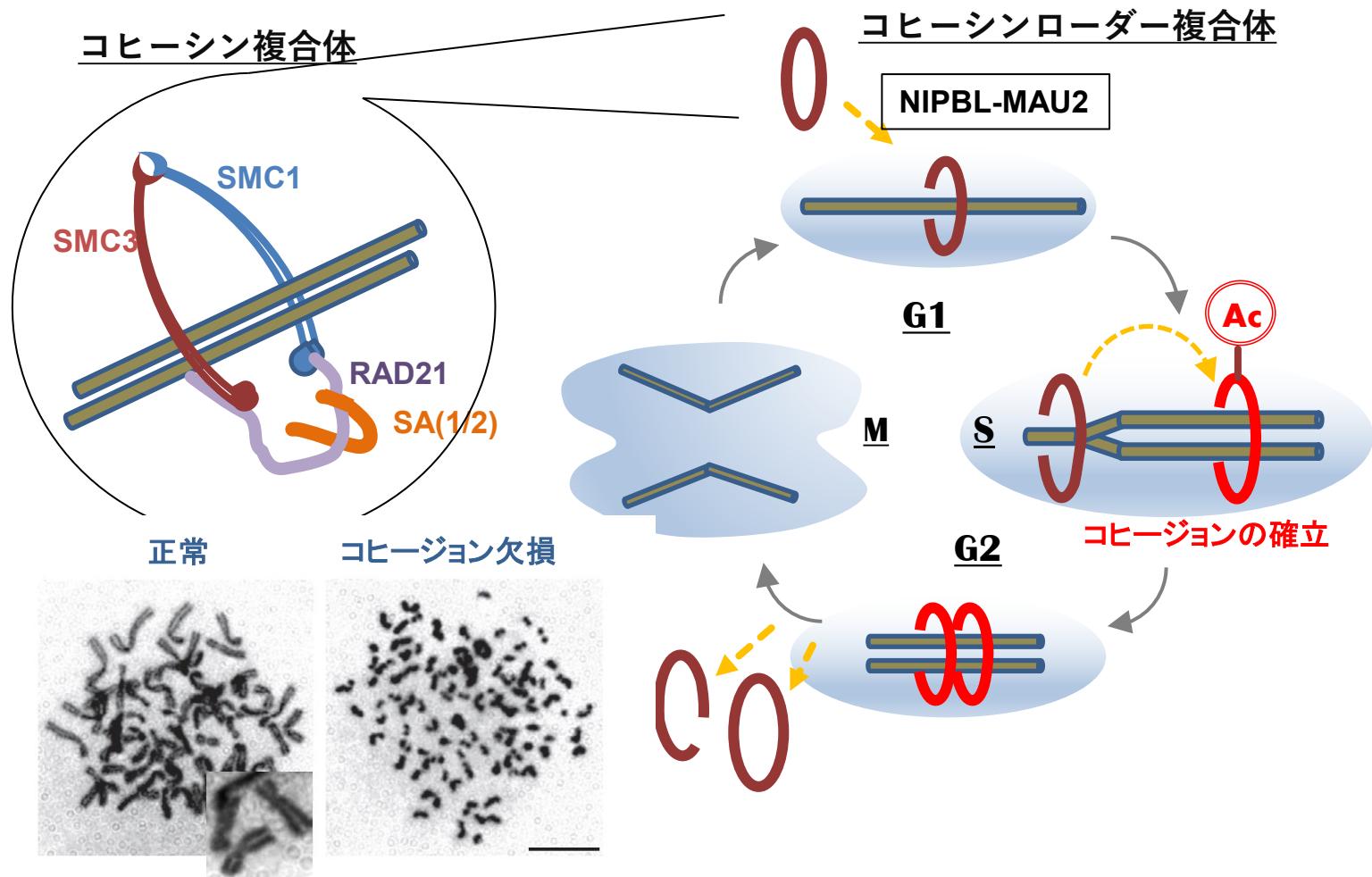
稀少疾患研究の意味



ゲノムの階層的な構造が遺伝子の発現の選択と制御を担う



コピーシンと姉妹染色分体間接着（コヒージョン）機能



コヒーチンの転写制御への関与は30年来の謎

コレネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS)

—原因遺伝子の70%はコヒーチンローダーNIPBL遺伝子、
20%がSMC1A, SMC3, RAD21などのコヒーチン構成遺伝子

—特徴的な顔貌、小頭症、臓器不全や身体的成长不全
精神的発達遅延等の病態

—コヒーチンの染色体局在の減少

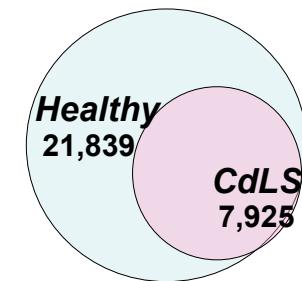
—コヒーチン欠損はみられない

—コヒーチン結合サイト付近の遺伝子の発現異常



(Krantz et al., *Nature genet.*, 2004)

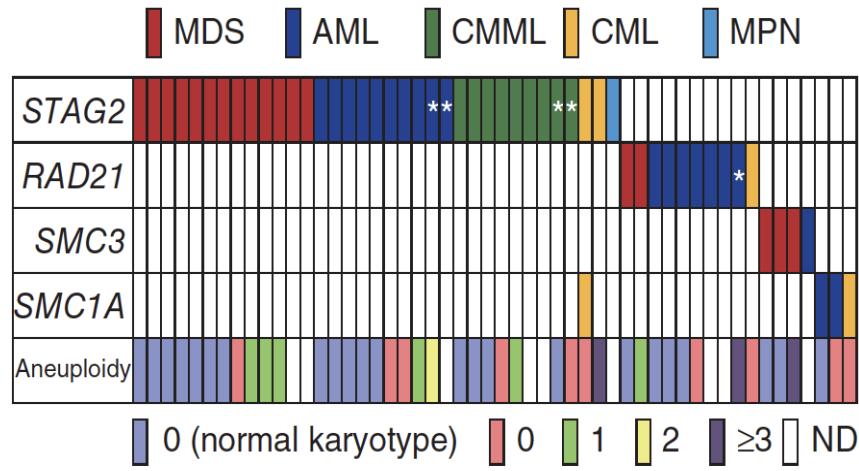
ChIP-chip; コヒーチン (RAD21)



(PLOS Biol., 2009)

胎児期での細胞分化における転写調節の異常？

骨髓系腫瘍(myeloid neoplasms)では有意にコヒーレンスに変異が見つかる



MDS: myelodysplastic syndromes

AML: acute myeloid leukemia

CMMI: chronic myelomonocytic leukemia

CML: chronic myelogenous leukemia

MPN: myeloproliferative neoplasms

-コヒージョン欠損はない

-染色体の異数性はみられない

(*Nature genet.*, 2013)



AML, ALL (Acute lymphoblastic leukemia)

→ -HOX, 幹細胞維持
増殖、生存関連
遺伝子発現変動

Nextseq 2000

- コストパフォーマンスの向上

Paired End 200 bp 使用時

- 従来機(Hiseq2500): ¥2000 / Mread
- Nextseq 2000: ¥1240 / Mread

Single Read 50 bp 使用時

- 従来機(Hiseq2500): ¥500 / Mread
- Nextseq 2000: ¥620 / Mread

実験条件によっては恩恵が得られないケースも



- 実験あたりデータ量の縮小による実験回転率の向上

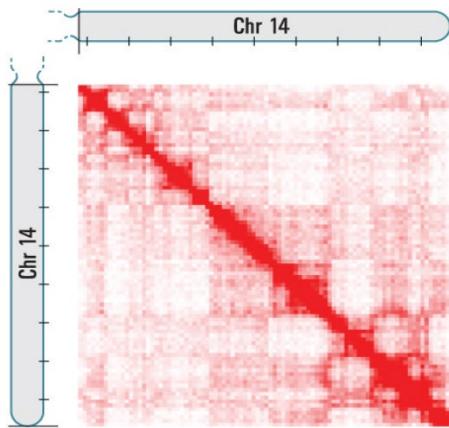
従来機に比べ1回の実験で取得できるデータ量が少ないためシーケンサーの回転率(実験の頻度)を増やすことができ、データ取得までの待ちが短くなる

- サンプル調製によるミスの低減、操作性の向上

フローセルの改良によりサンプルのOver loadによるラン失敗等がなくなり、一体型試薬カートリッジにより操作ミスの危険性が低減

ゲノム

顕微鏡



クロマチン構造
(Hi-C、ChIA-PET)

蛋白質局在・エピゲノム
(ChIP-seq)

オープンクロマチン
(ATAC、FAIRE)

細胞
(10-100 μm)
 10^9 塩基対

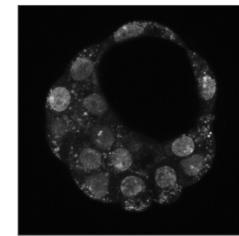
染色体
(1-10 μm)
 10^7 - 10^8 塩基対

クロマチンドメイン
(0.1-1 μm)
 10^4 - 10^6 塩基対

ヌクレオソーム
転写因子結合
(1-100 nm)
 10^1 - 10^3 塩基対

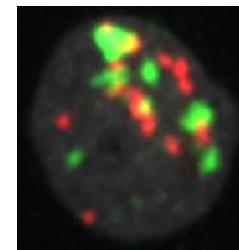
顕微鏡

生体イメージング



透明化

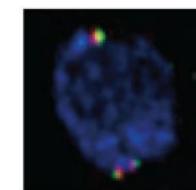
光学顕微鏡



生細胞イメージング

ゲノム可視化

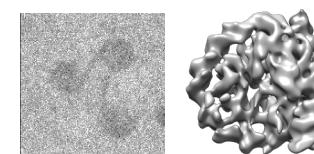
超解像顕微鏡



蛋白質機能・修飾

蛋白質間相互作用

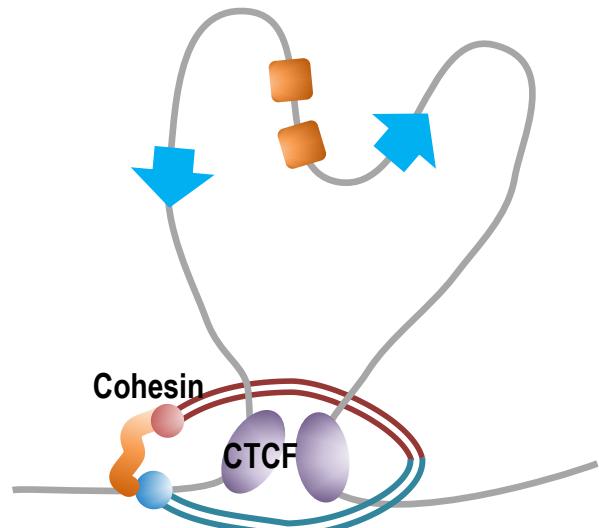
クライオ電顕



分子複合体構造

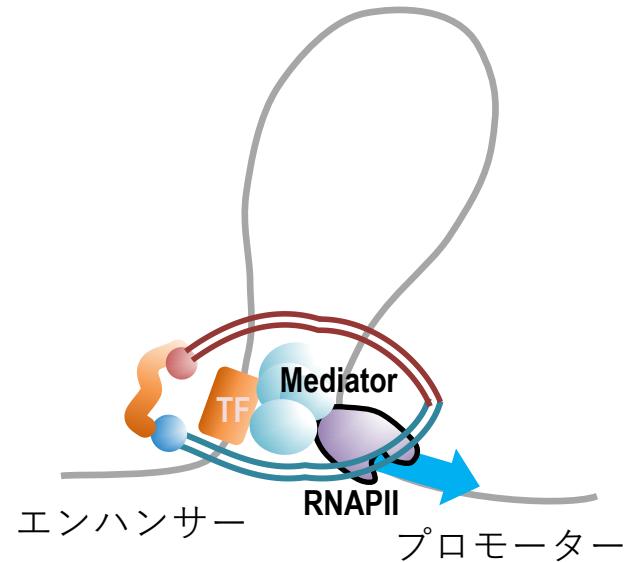
コヒーレンスが転写を制御するメカニズムとは？

コヒーリンによるゲノム構造形成の2つのモデル



TAD(インシュレーター)ループ構造

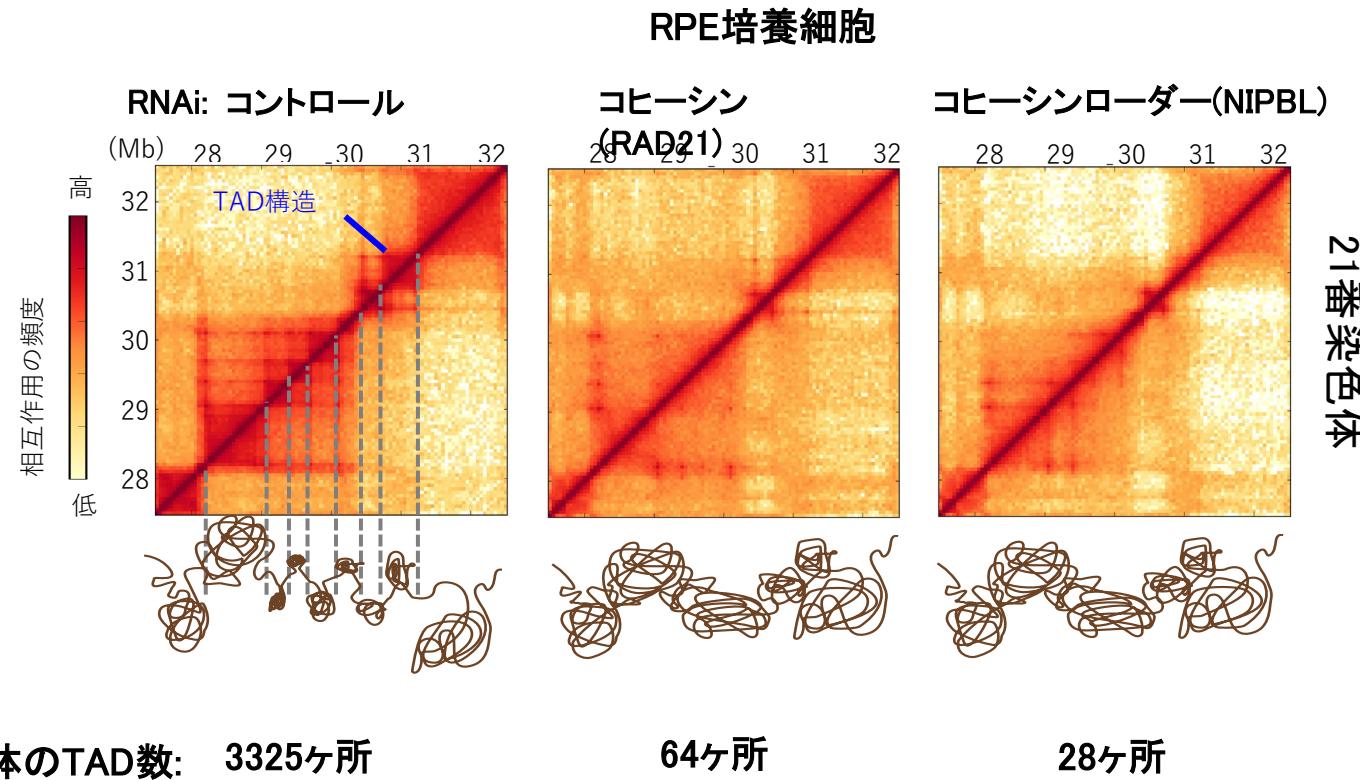
(*Nature*., 2008)



エンハンサー/プロモーターループ構造

(Kagey et al, *Nature*., 2010)

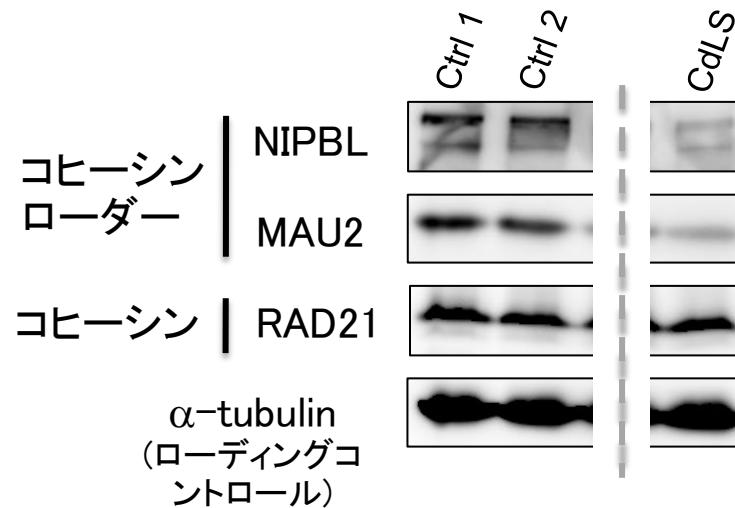
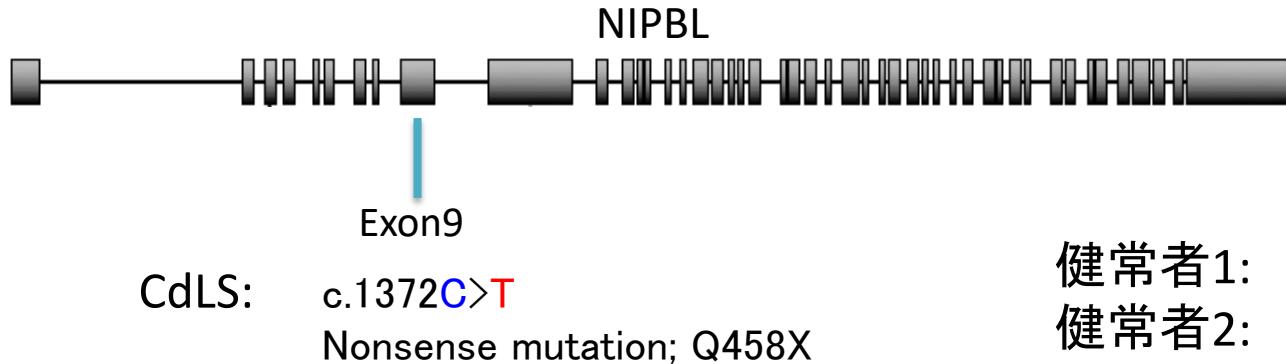
コヒーチンとコヒーチンローダーはTAD構造の形成に必須



CdLS患者細胞ではTADに変化は見られるのか？

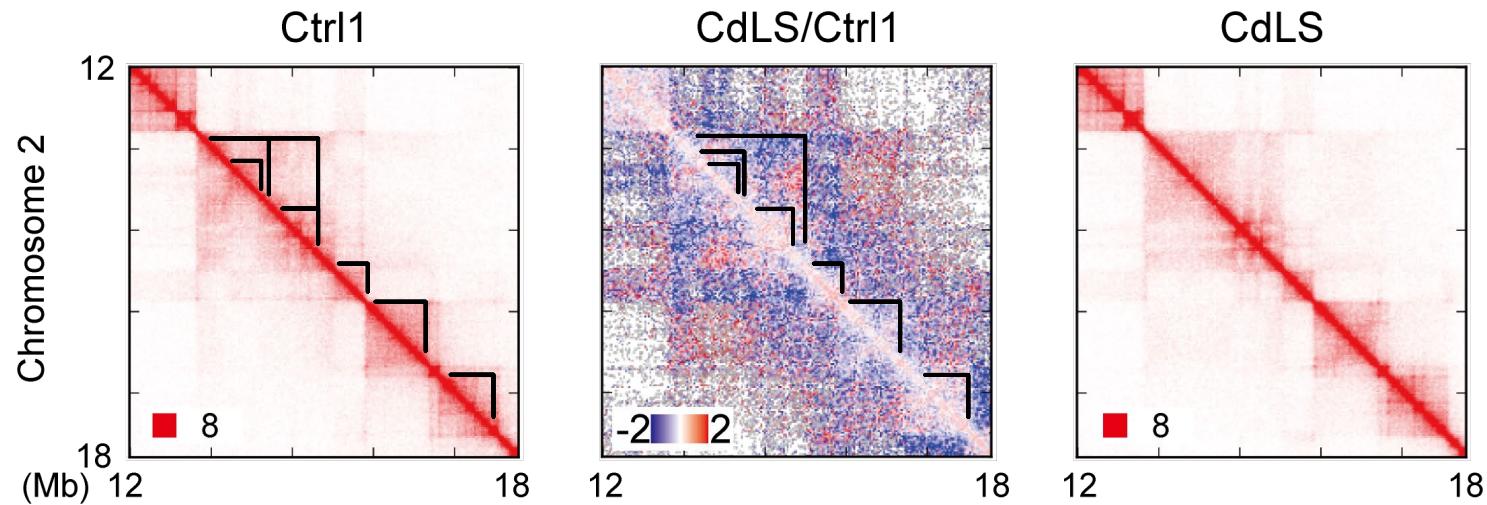
(Sakata ,unpublished
)

CdLS患者由来細胞におけるHi-C解析



(Sakata ,unpublished)

CdLSではTAD構造が維持されている

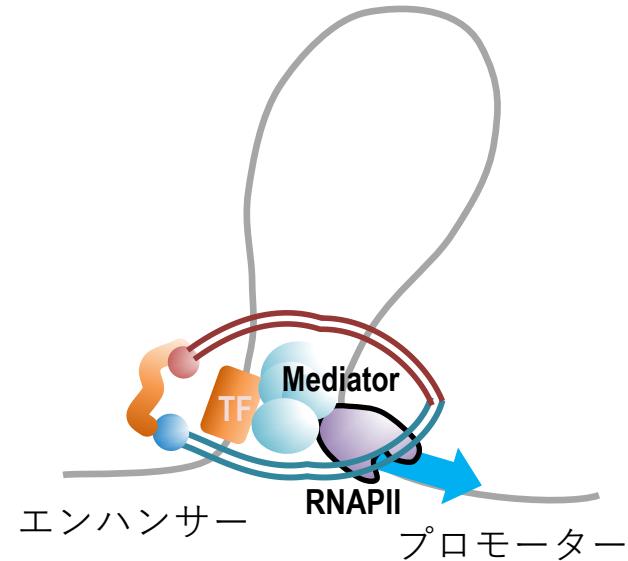


(Sakata ,unpublished
)

CdLSはエンハンサー/プロモーター間の転写制御の異常が原因？



TADループ構造



エンハンサー/プロモーターループ構造

(Kagey et al, *Nature*., 2010)

CdLSに類似したCHOP症候群の発見

CHOPS患者



T254S



T254A

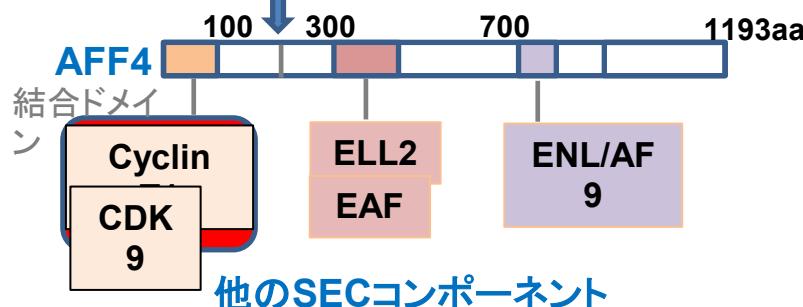


R258W



Super Elongation Complex(SEC)

T254/R258 Missense mutations \Rightarrow AFF4 の増加



-CdLSの病態と類似

-遺伝子発現変動プロファイルの類似

-コヒーチンローダーの染色体局在の減少

-コヒーチンとAFF4を含む転写複合体の相互作用

患者由来細胞

WT #1 #2 T254S T254A R258W

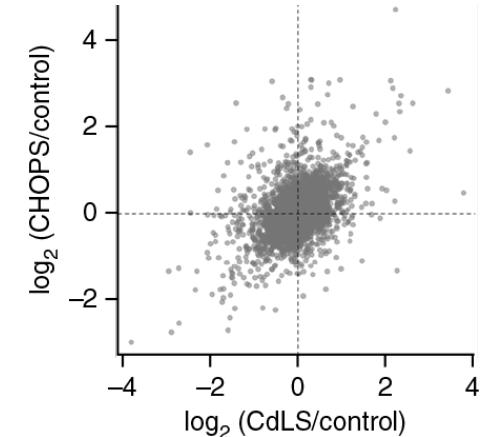
AFF4

NIPBL

MAU2

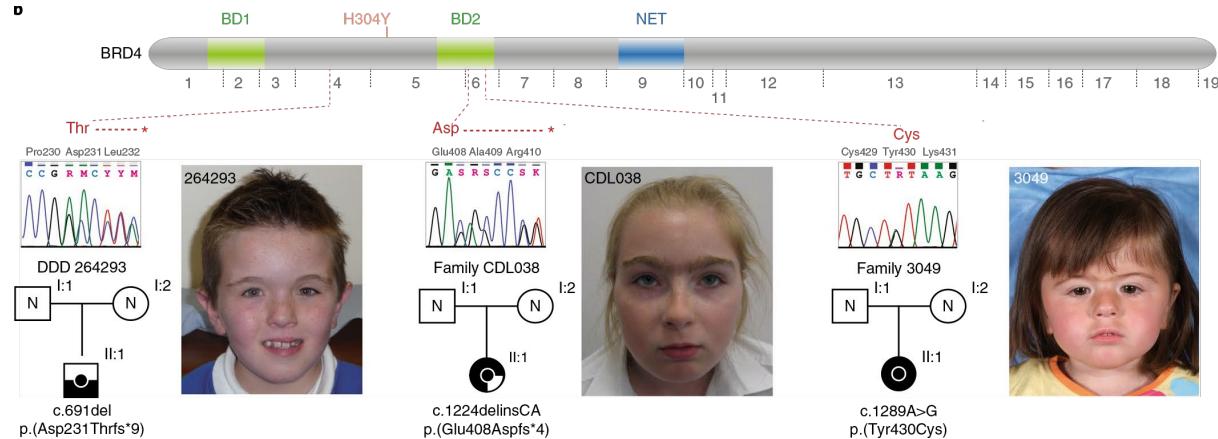
SMC1

CdLSと類似の転写プロファイル

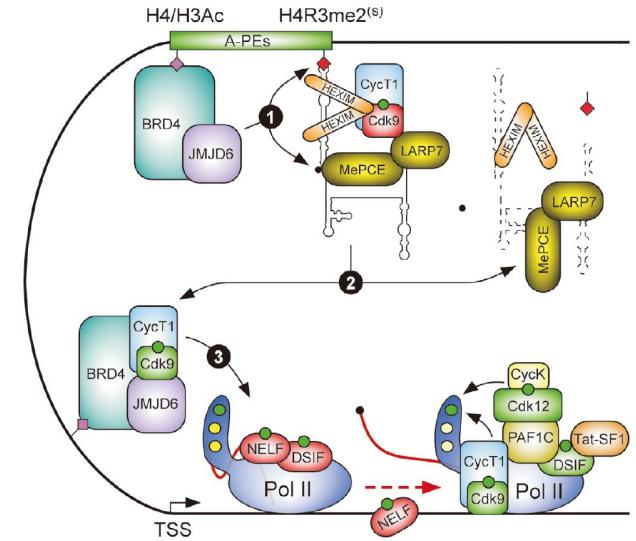


(Nature genet., 2015)

CdLSの新たな原因遺伝子BRD4の同定



(Olley et al., 2018)



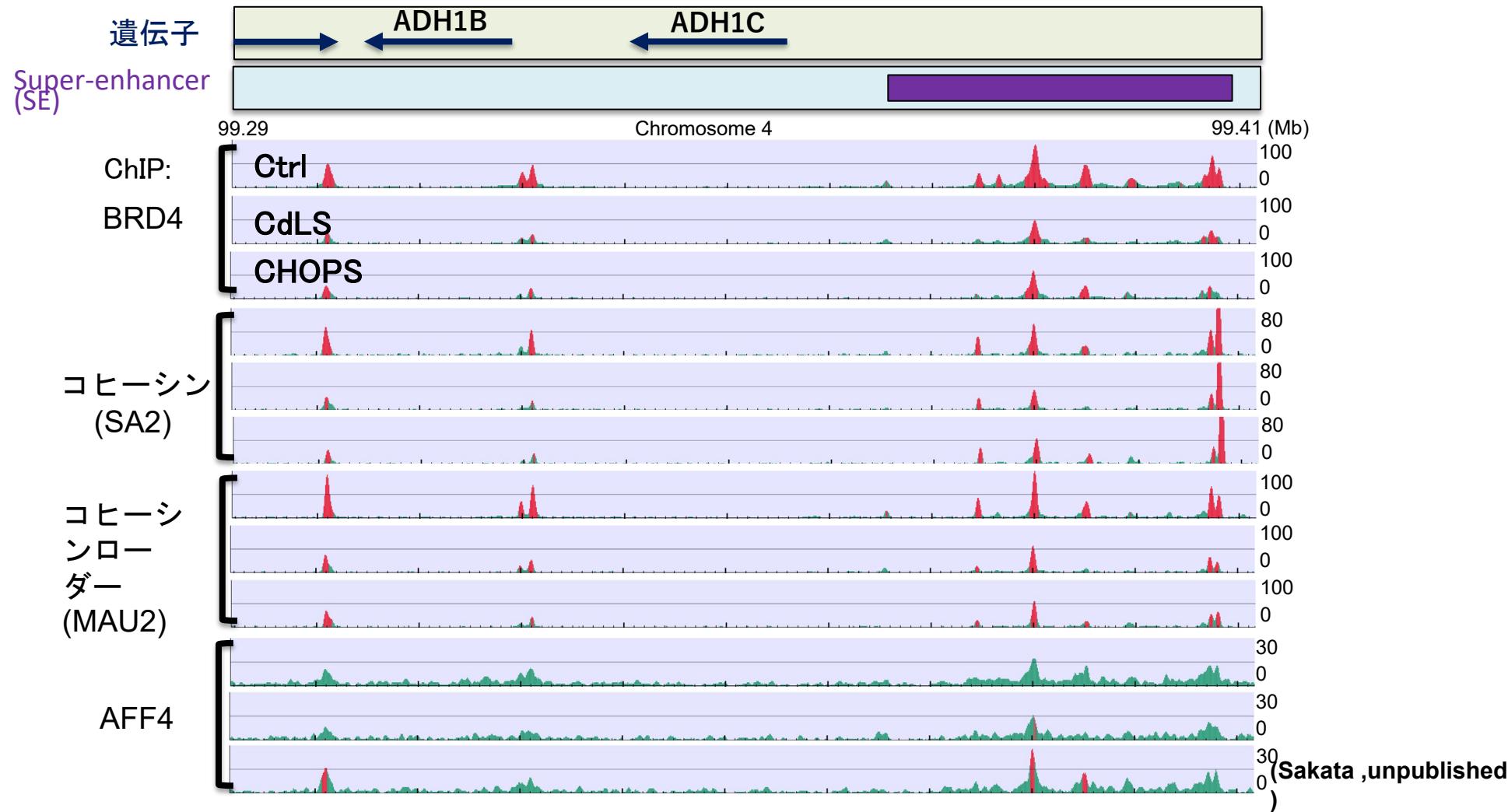
(Quaresma et al., 2016)

- BRD4の変異によってCdLSが引き起こされる
- この変異ではBRD4の染色体局在が減少している
- BRD4はエンハンサー及びスーパーインハンサー(SE)でコヒーレンシローダーと共に局在している

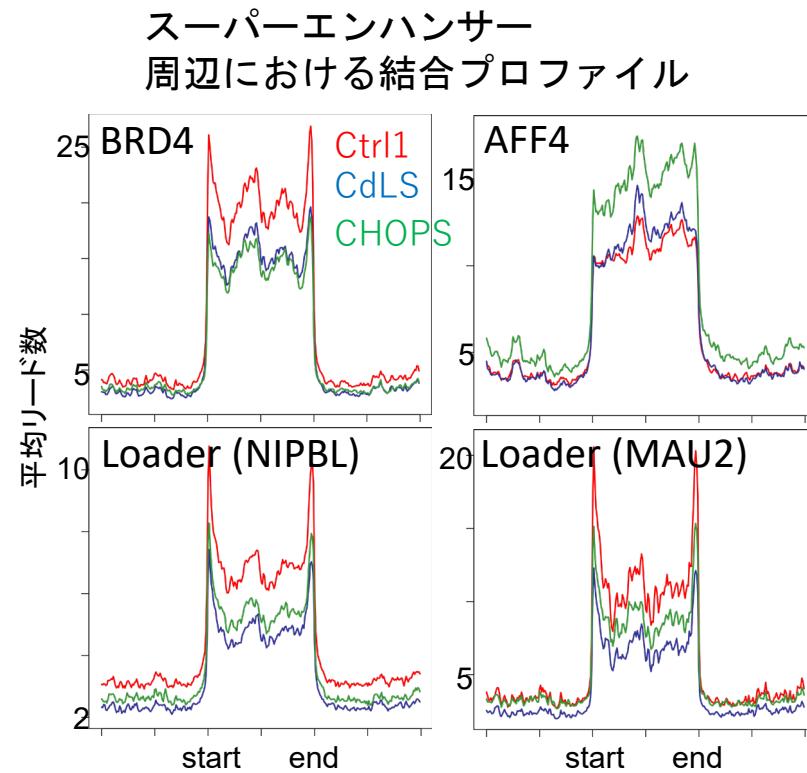
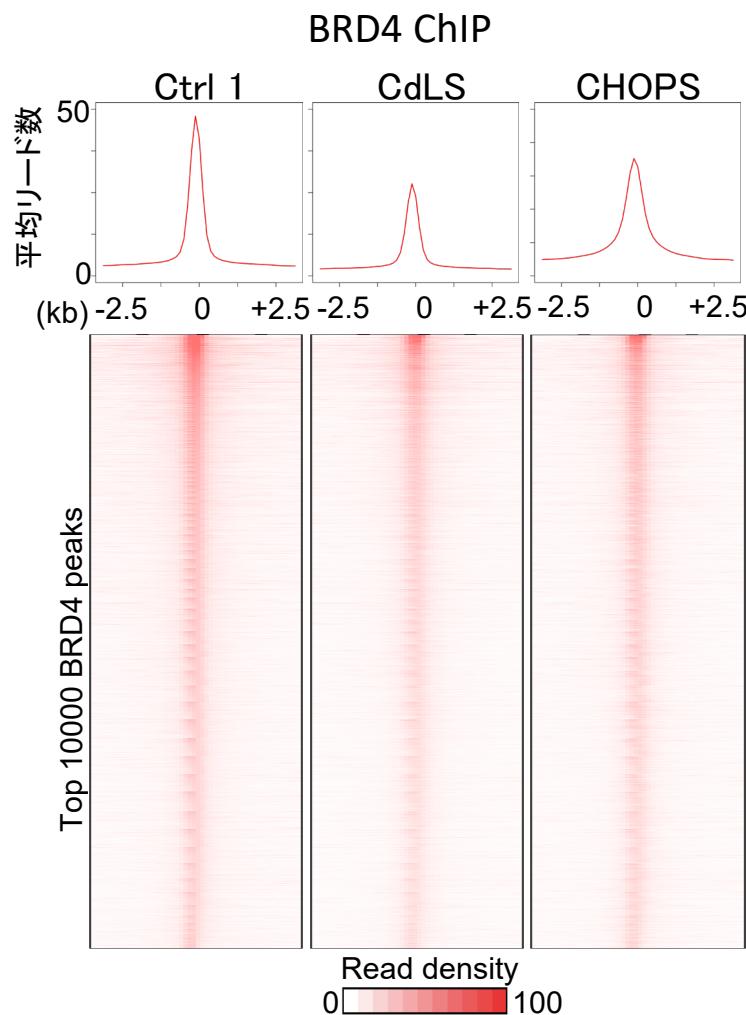
BRD4の機能

- アセチル化ヒストンに結合する
- エンハンサー及びスーパーインハンサーに局在
- RNAポリメラーゼIIによる転写伸長反応を促進する

CdLS及びCHOPSにおいてSEでのBRD4の局在が減少している



CdLS及びCHOPSにおいてSEでのBRD4の局在が減少している



(Sakata ,unpublished)

BRD4（及びコヒーシンローダー）の減少はCdLSとその類似疾患で共通している

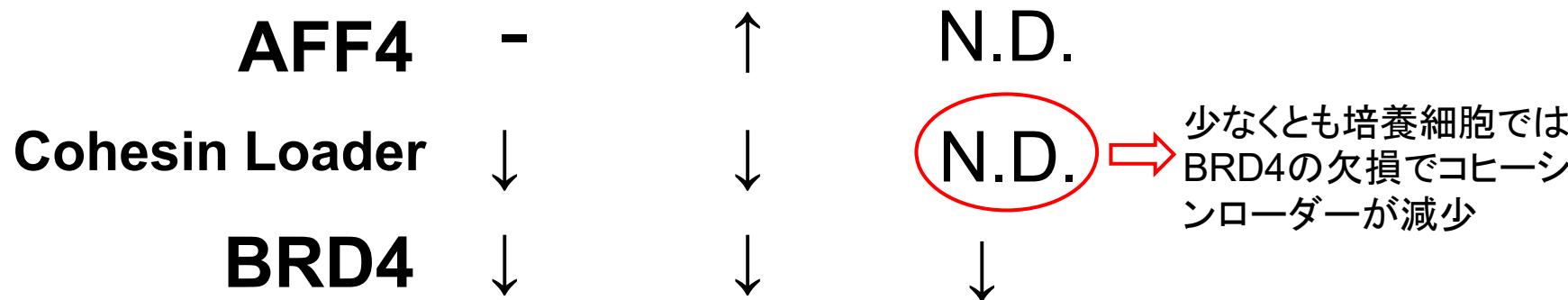
変異遺伝子: Cohesin/NIPBL AFF4 BRD4



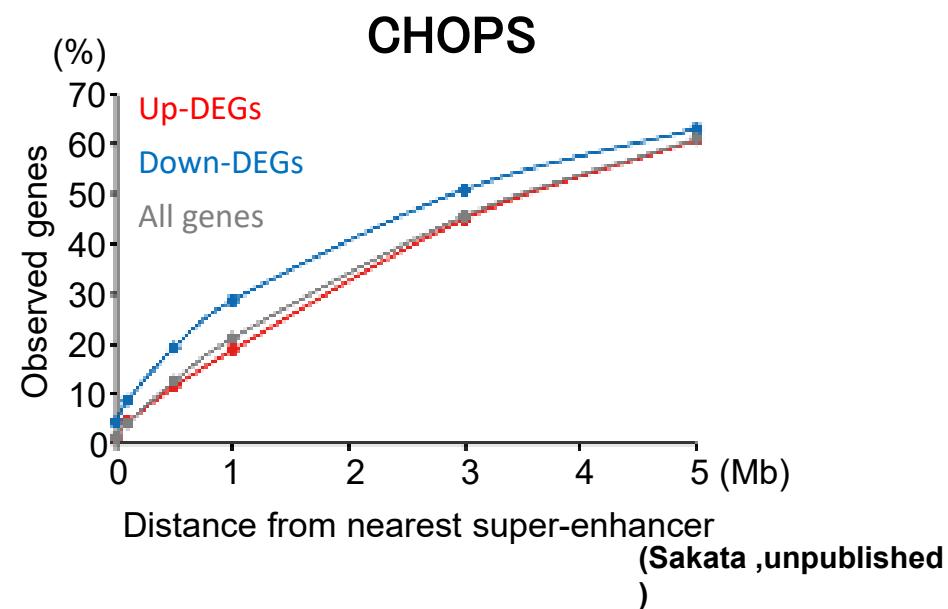
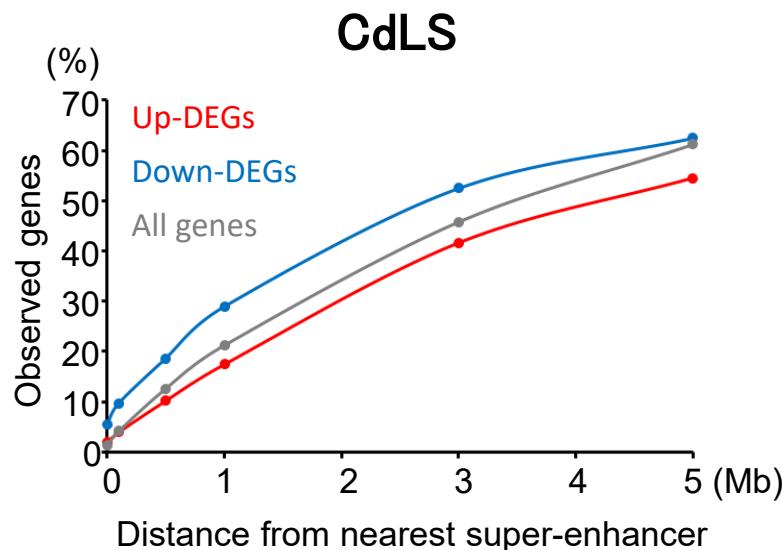
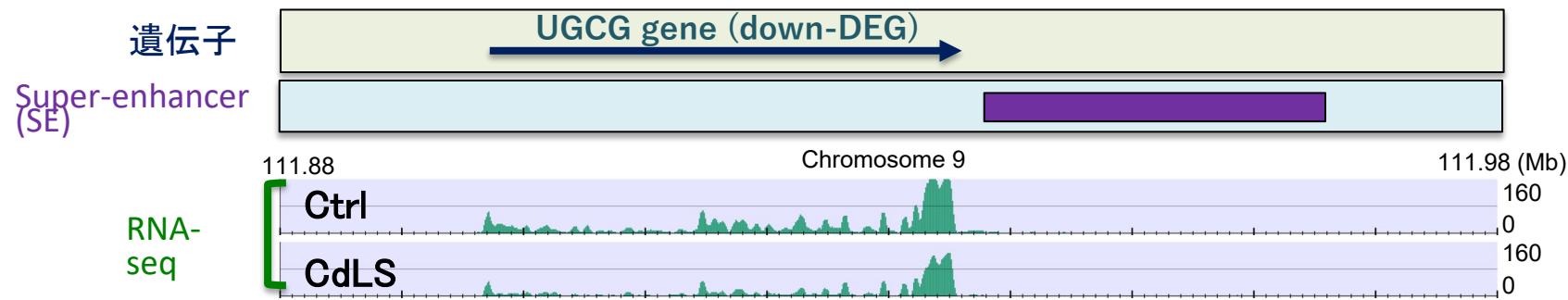
CdLS

CHOPS

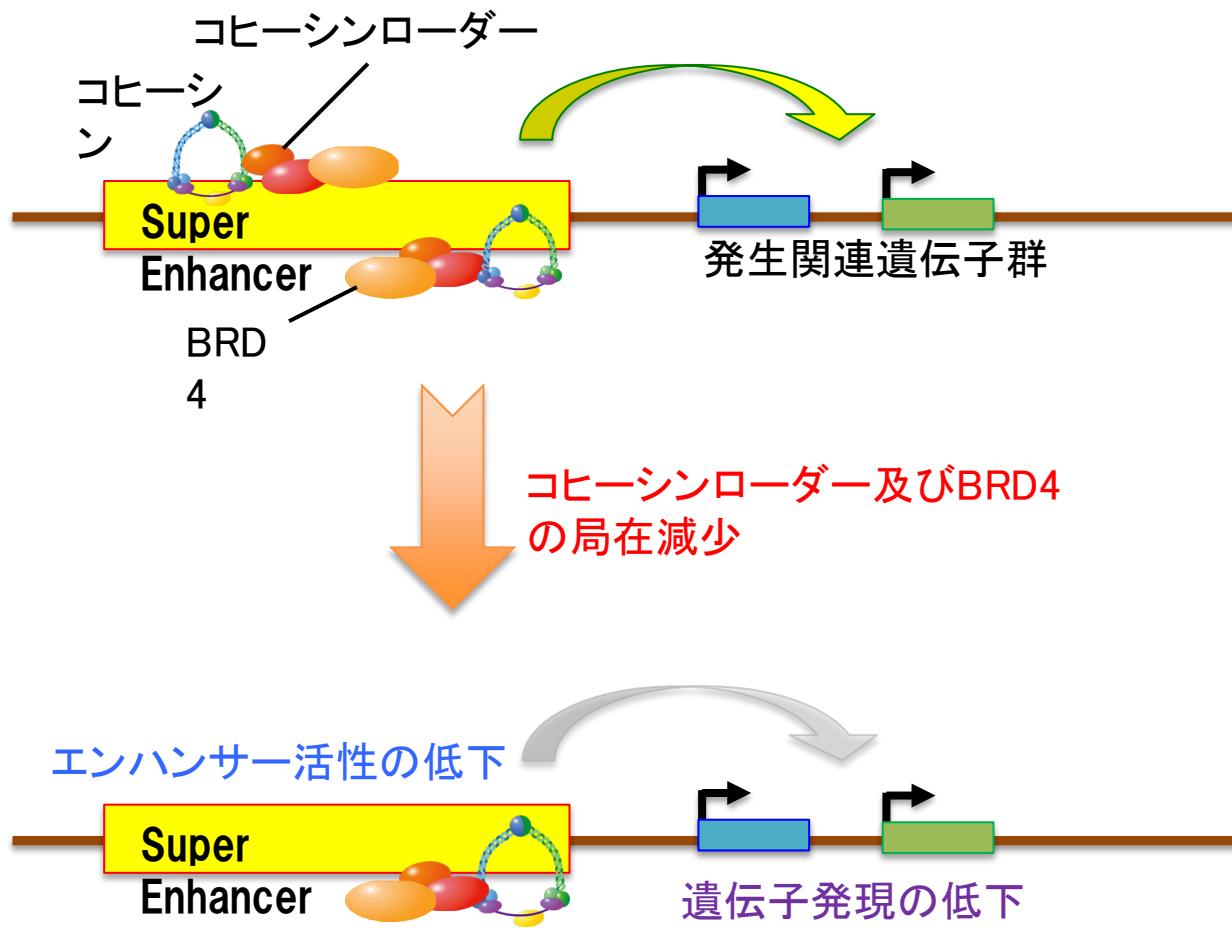
CdLS



CdLS及びCHOPSで発現減少する発現変動遺伝子(DEG)はSE周辺に局在する

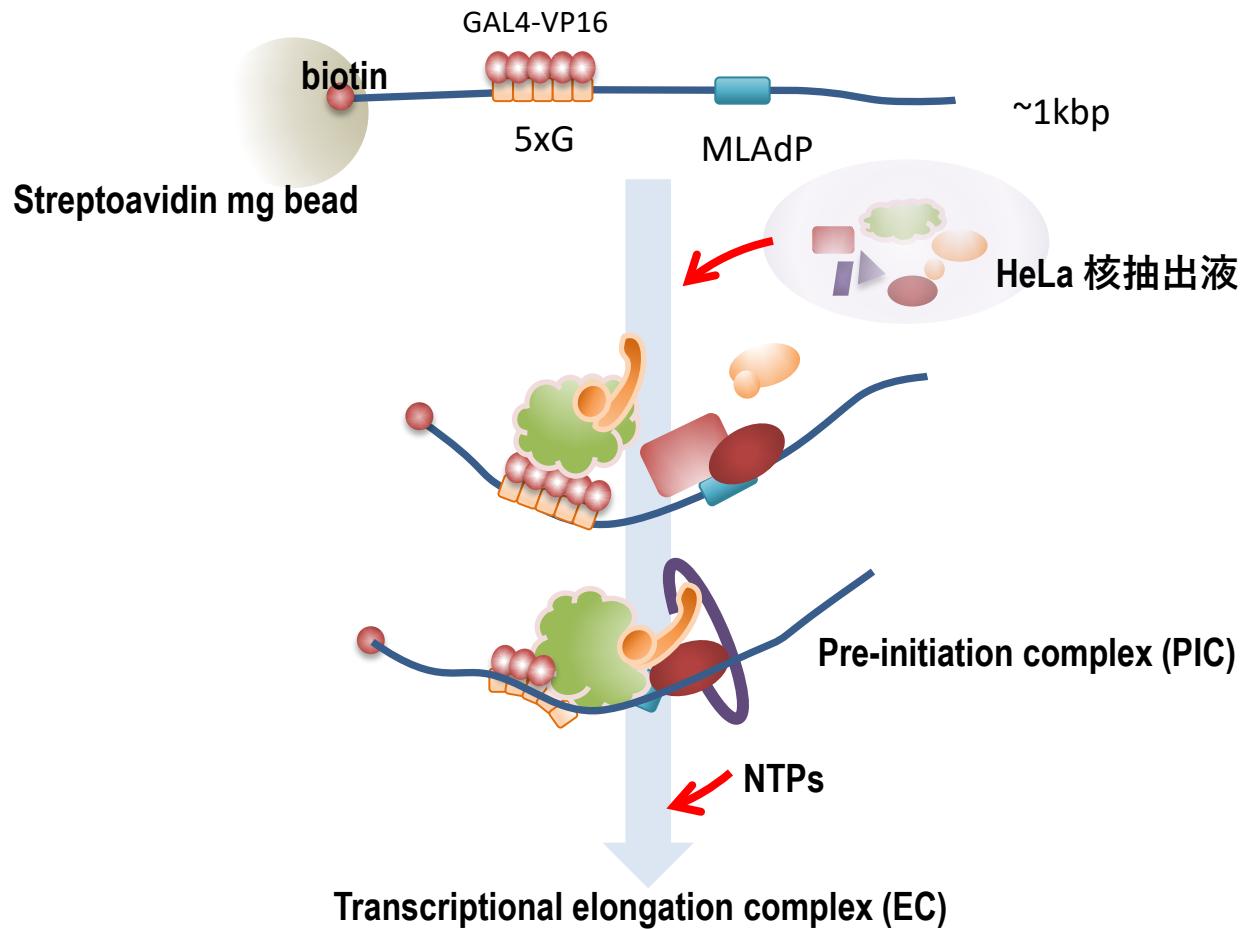


CdLS及びCHOPSにおいて遺伝子制御異常が引き起こされるメカニズムのモデル



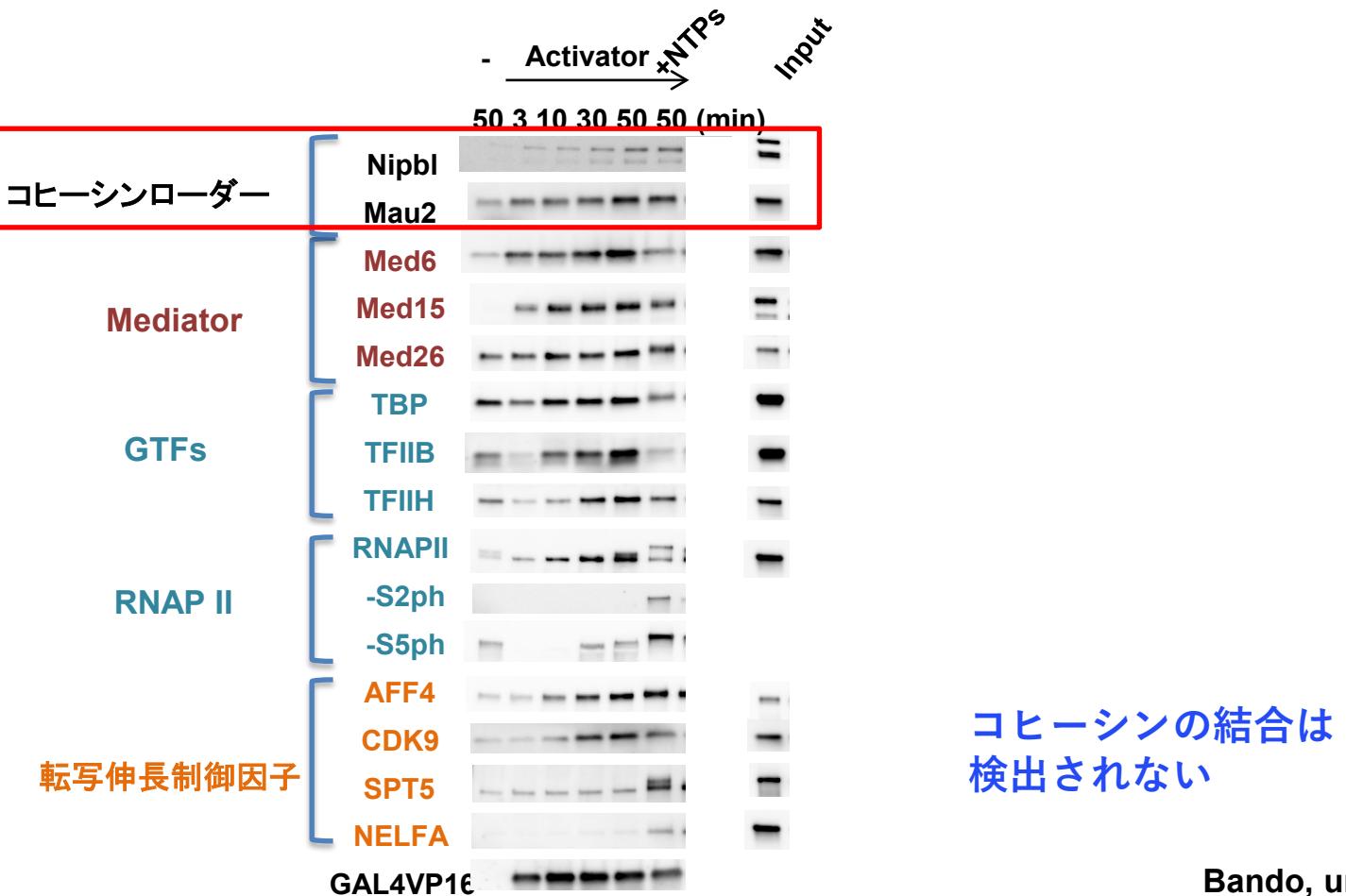
コヒーランスとそのローダーがエンハンサー及び
プロモーターの活性を制御するメカニズムとは？

In vitro アッセイ 転写開始及び転写伸長複合体の形成

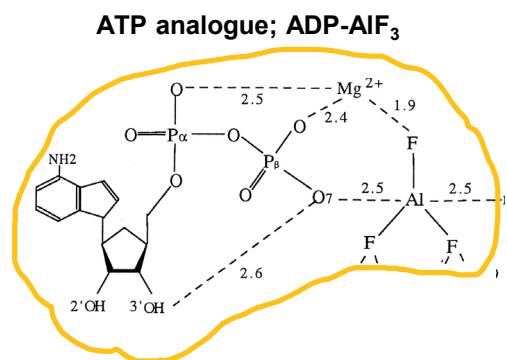
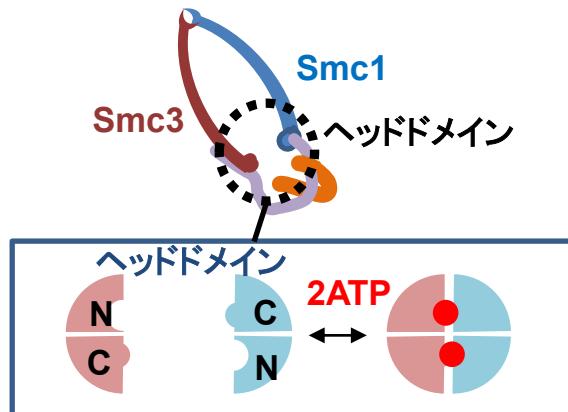


(Lin et al., Curr Protoc Mol Biol. 2012)

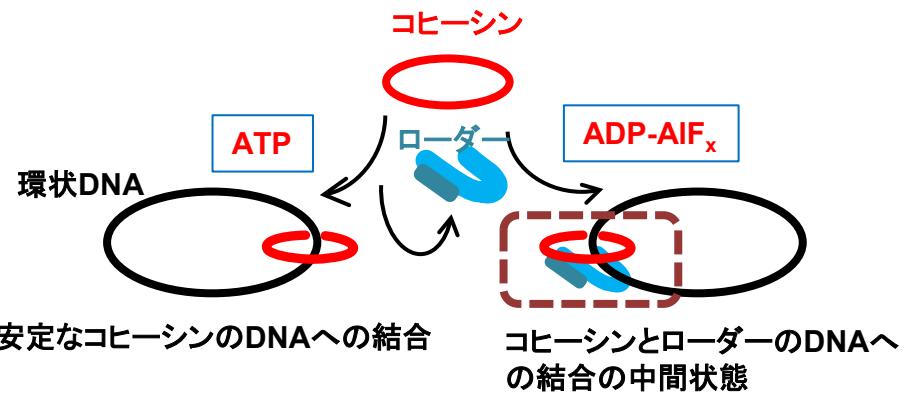
コピーシンローダーはPIC形成に伴い、アクティベータ依存的にリクルートされる



ATPアナログ(ADP-AIF₃) はコヒーレンとローダー及びDNAの結合を安定化させる

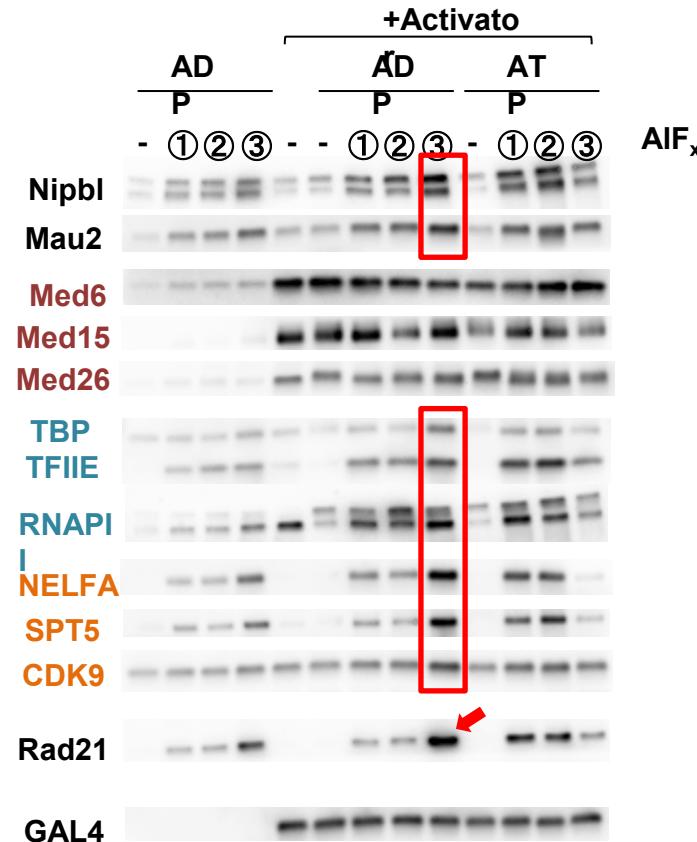
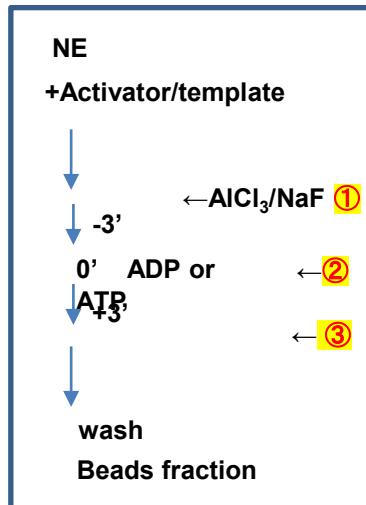
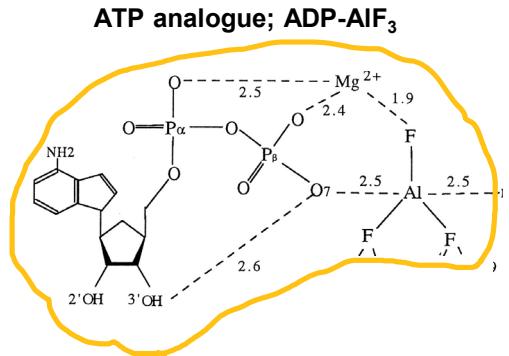


In vitro cohesin loading assay



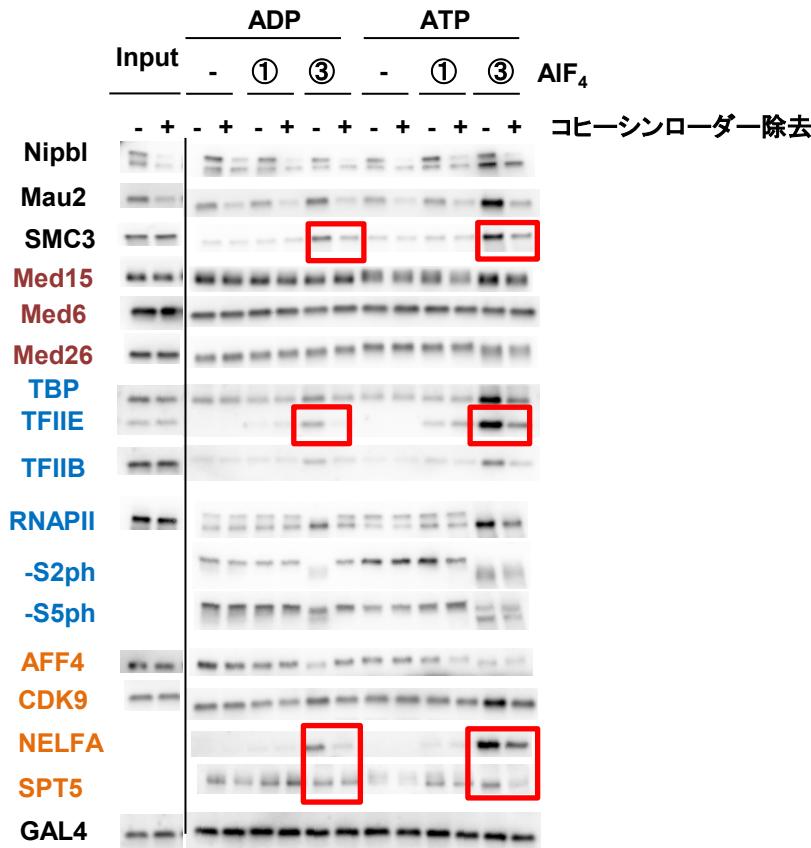
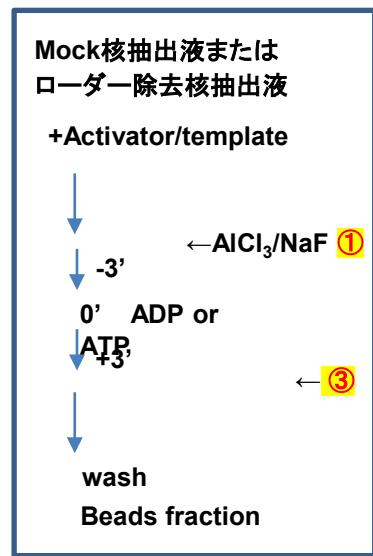
(Murayama et al., *Nature* 2014,
Çamdere et al., *PNAS* 2018, Minamino et al., *Life Science Alliance* 2018)

ATPアナログ(ADP-AIF₃) がPIC形成と伸長因子のリクルートを促進する



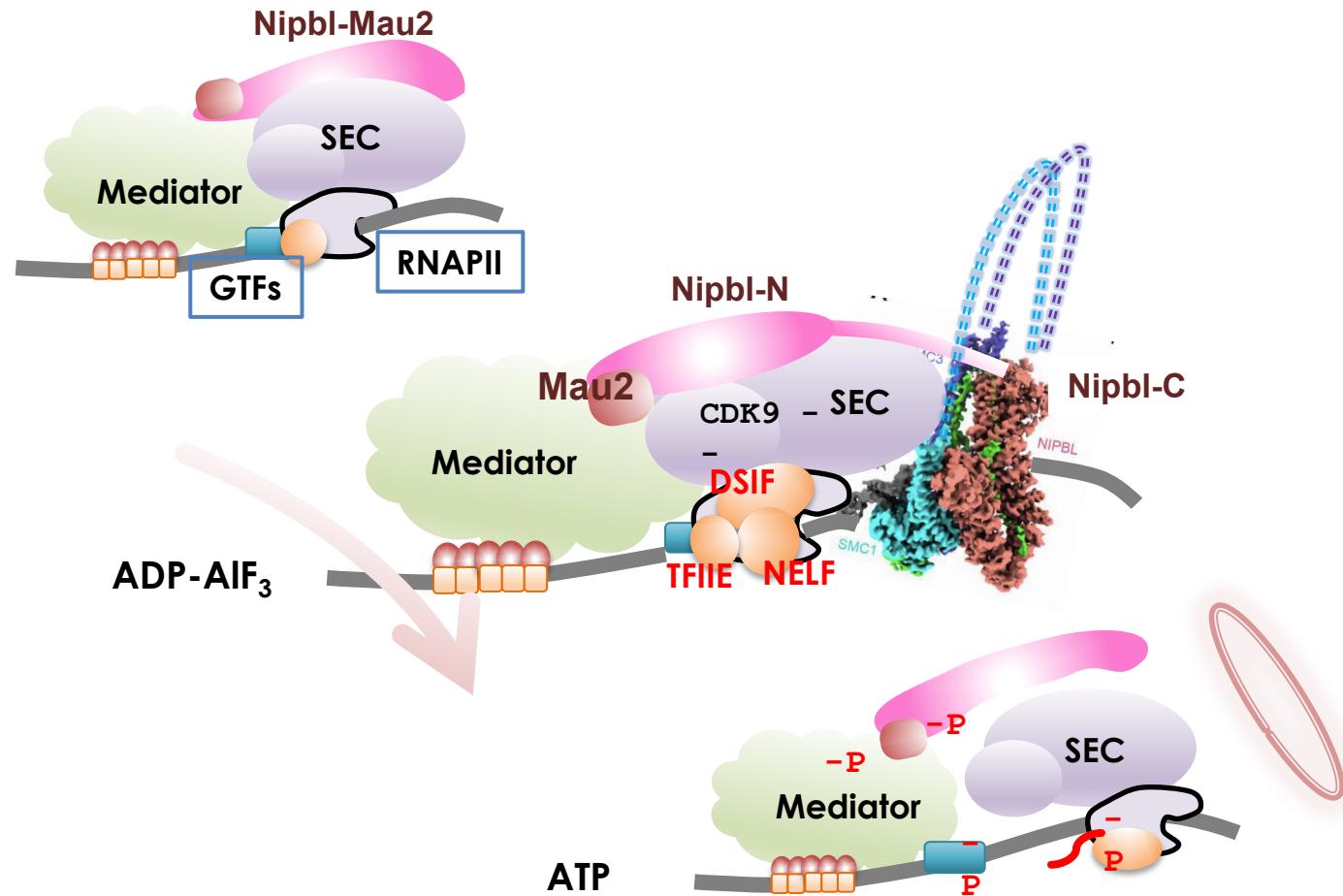
Bando, unpublished

ATPアナログの効果はコヒーチンローダーに依存する



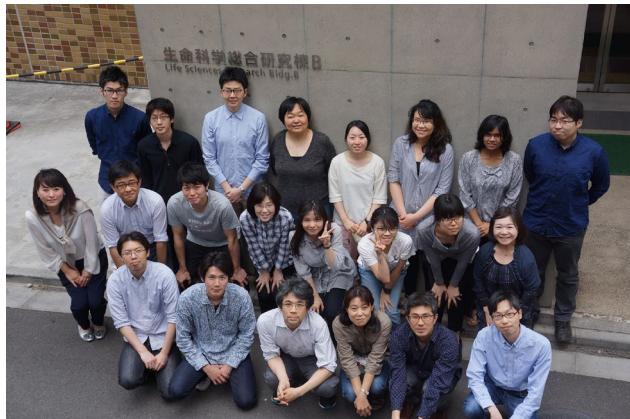
Bando, unpublished

In vitro アッセイの転写開始中間複合体のモデル



謝辞

Shirahige's Group members



Prof. Takehiko Itoh (TIT)
Dr. Ian D Krantz (CHOP)
Dr. Kosuke Izumi (CHOP)
Dr. Toru Hirota (JFCR)
Dr. Ryuichiro Nakato
Dr. Naohito Nozaki (MABI)

IQB