

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

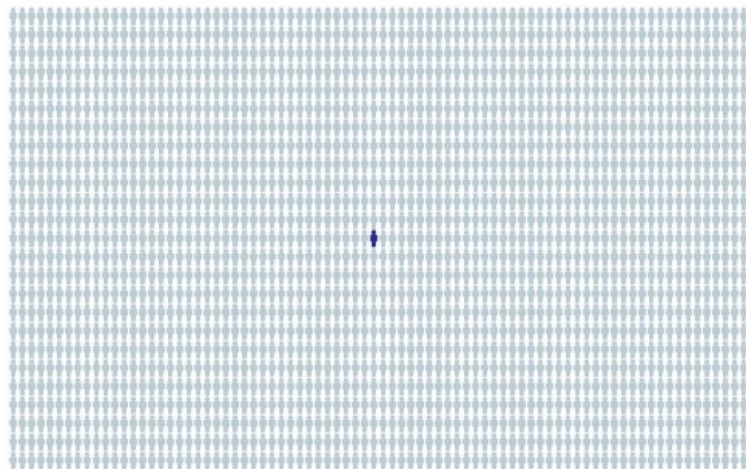
希少疾患とは？

- 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

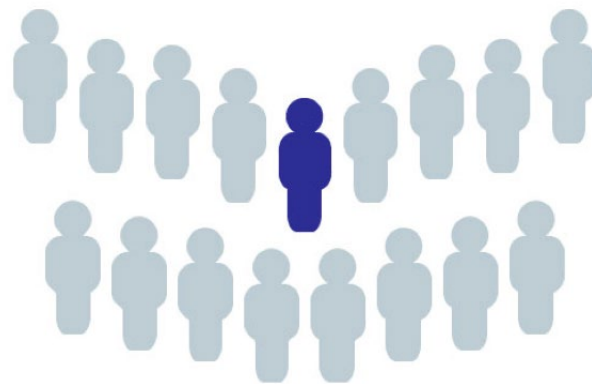
希少疾患はどの程度存在するのか？

- 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



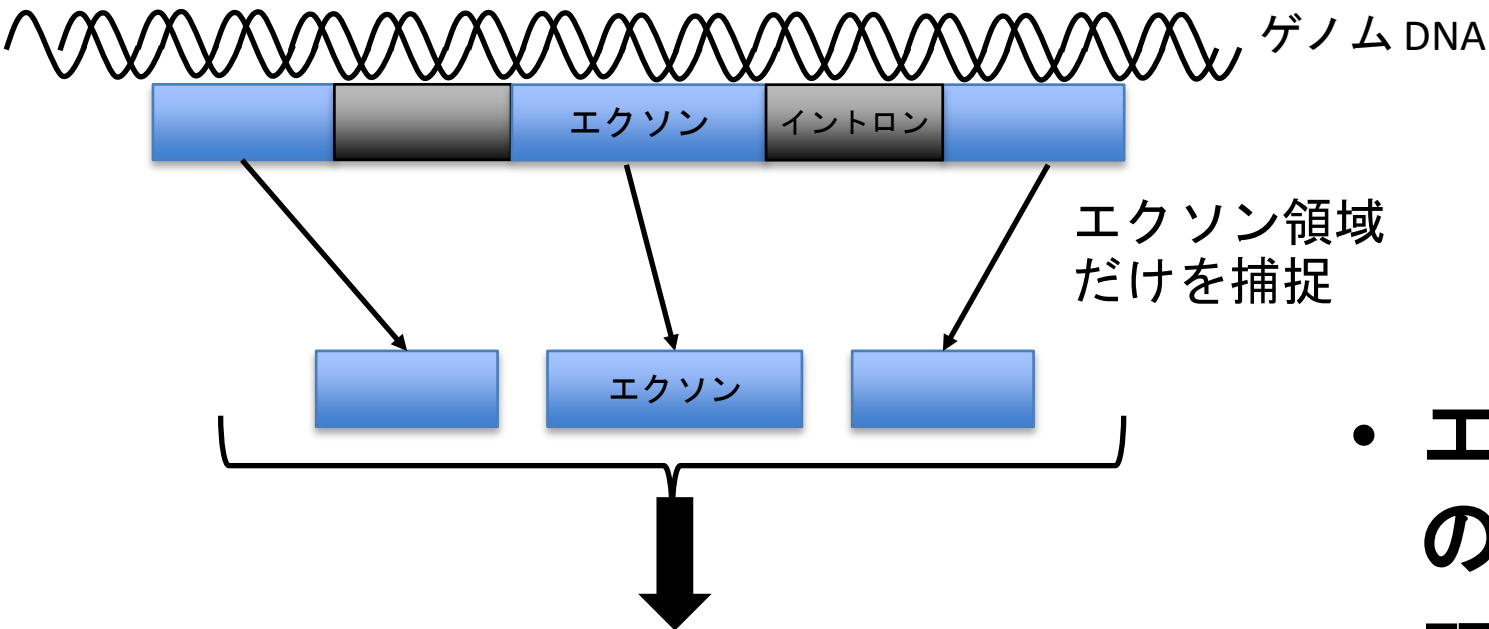
But, collectively,



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！

エクソーム解析



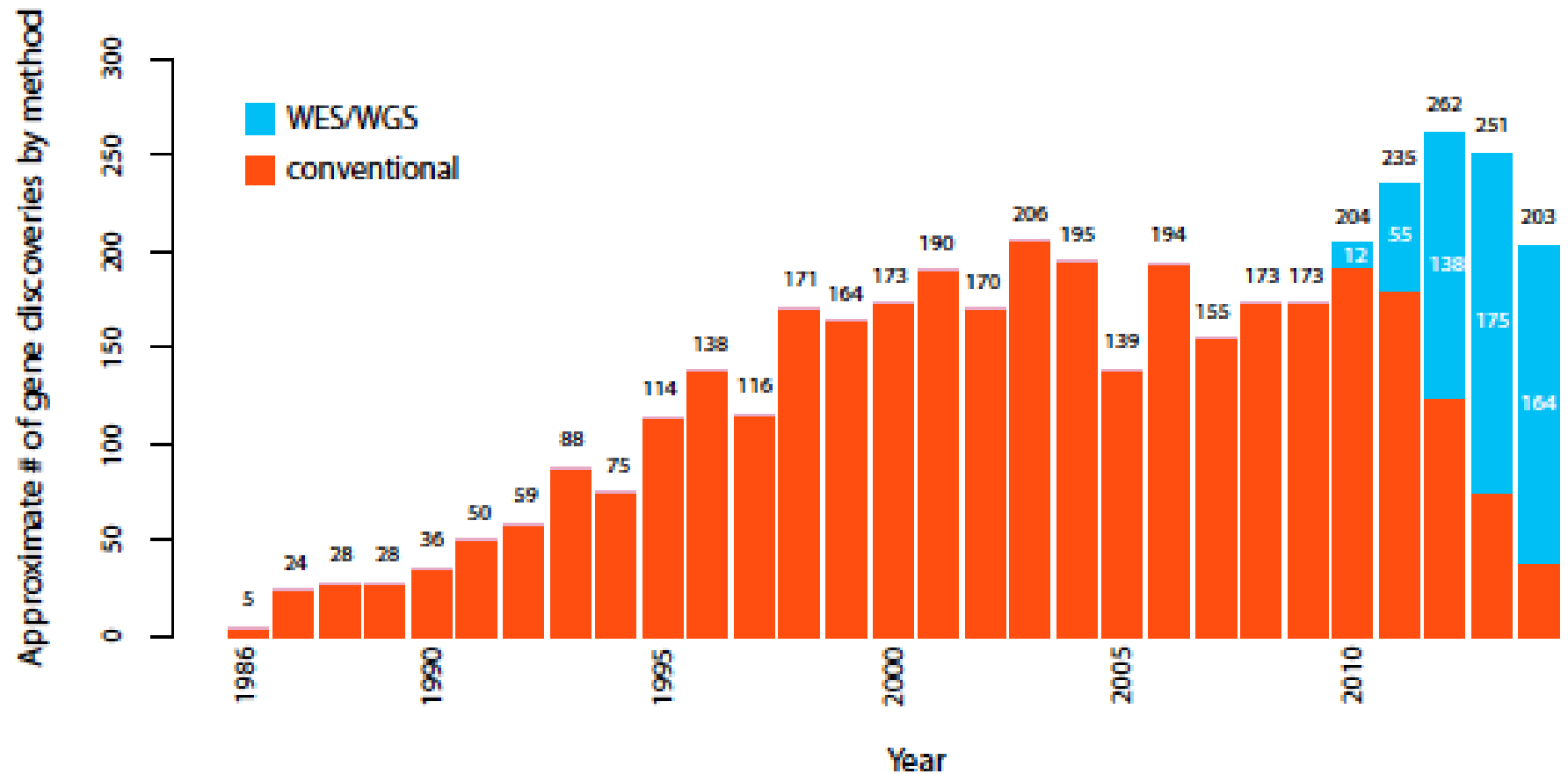
- エクソン:ゲノムの1%

- 既知の疾患の85%はエクソンに

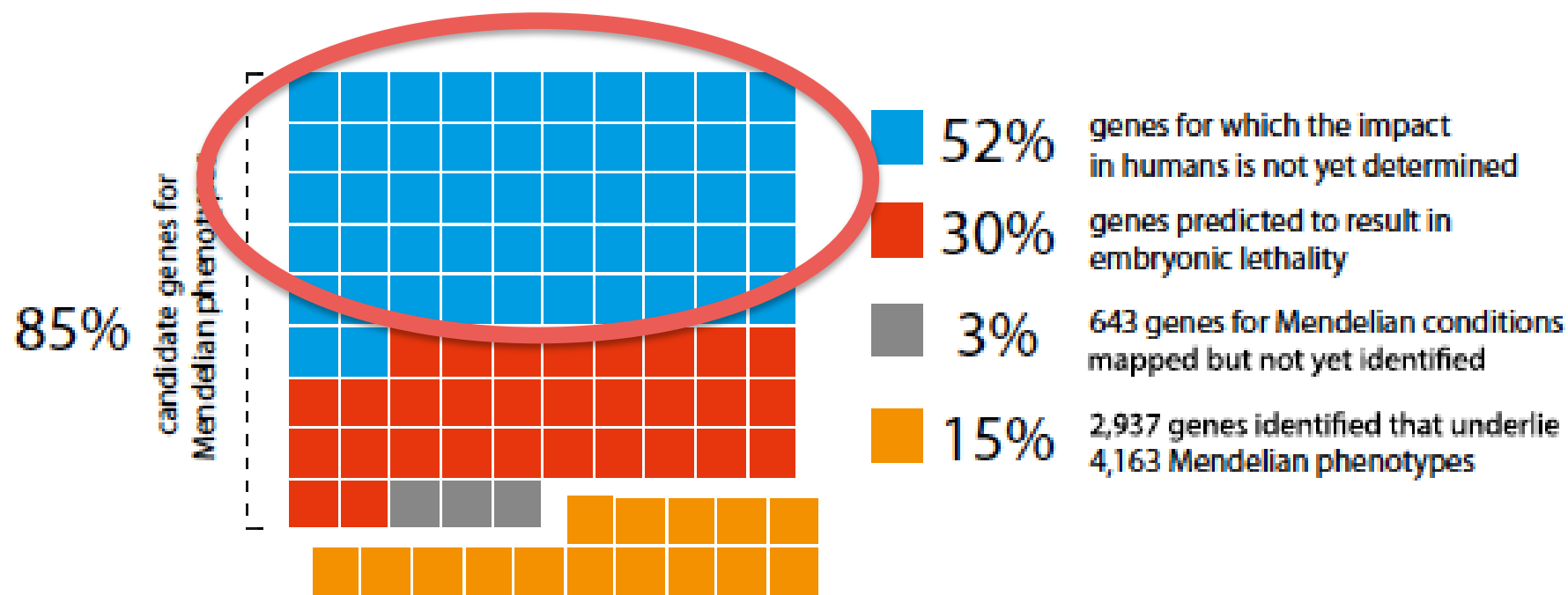
変異を持つ
ハイスループット
次世代シーケンサー



希少疾患原因遺伝子の発見

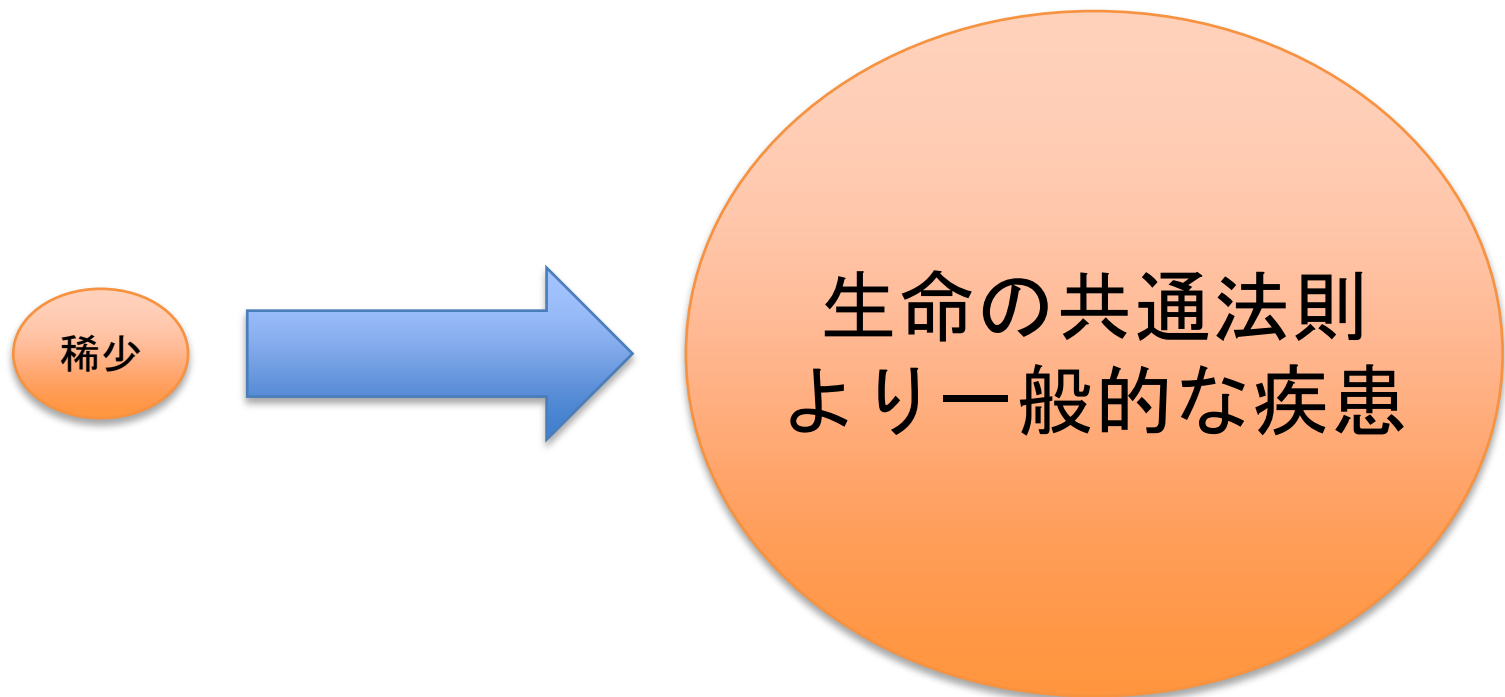


タンパクをコードする遺伝子と疾患の関係

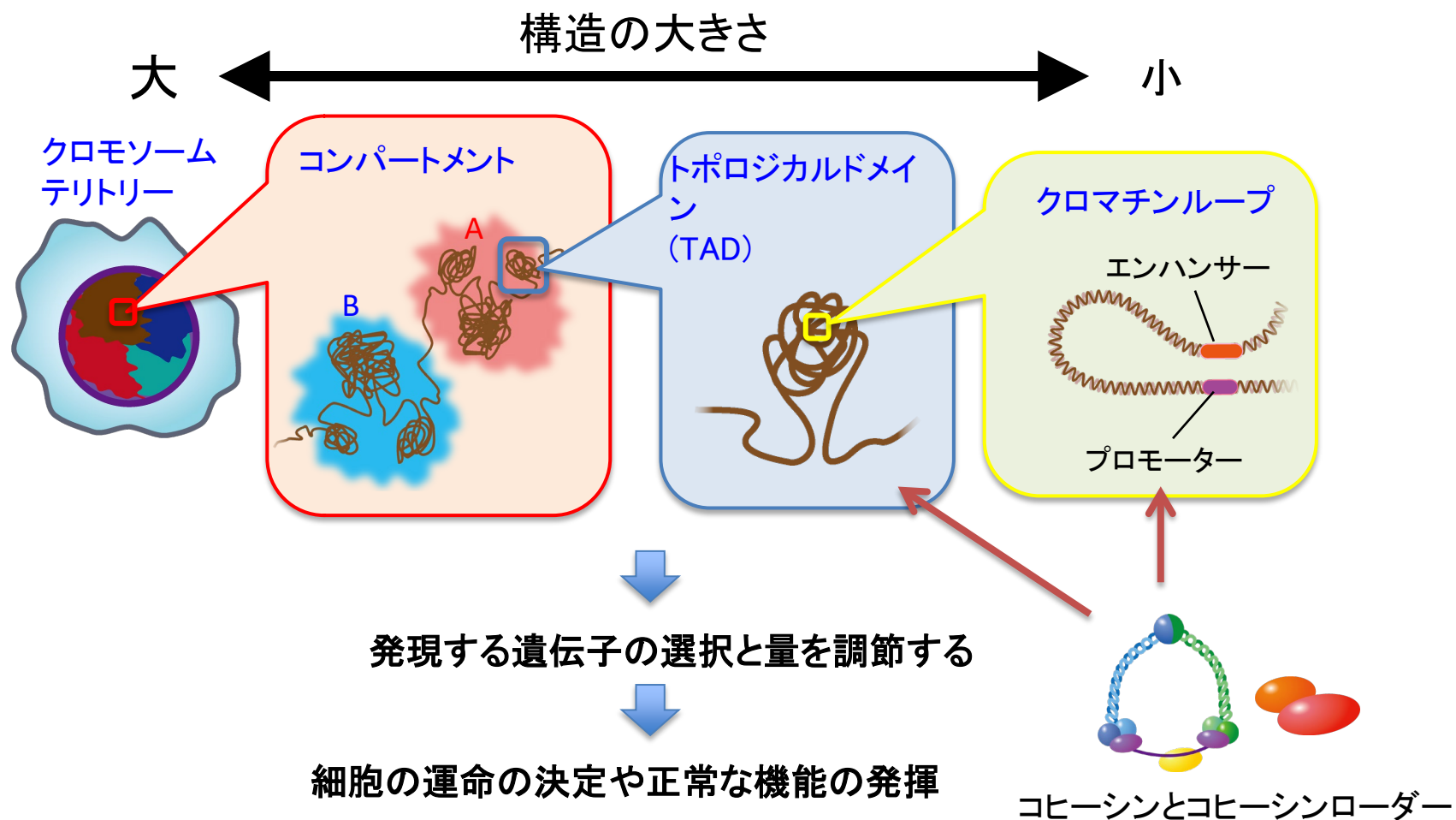


まだまだやるべきことはある

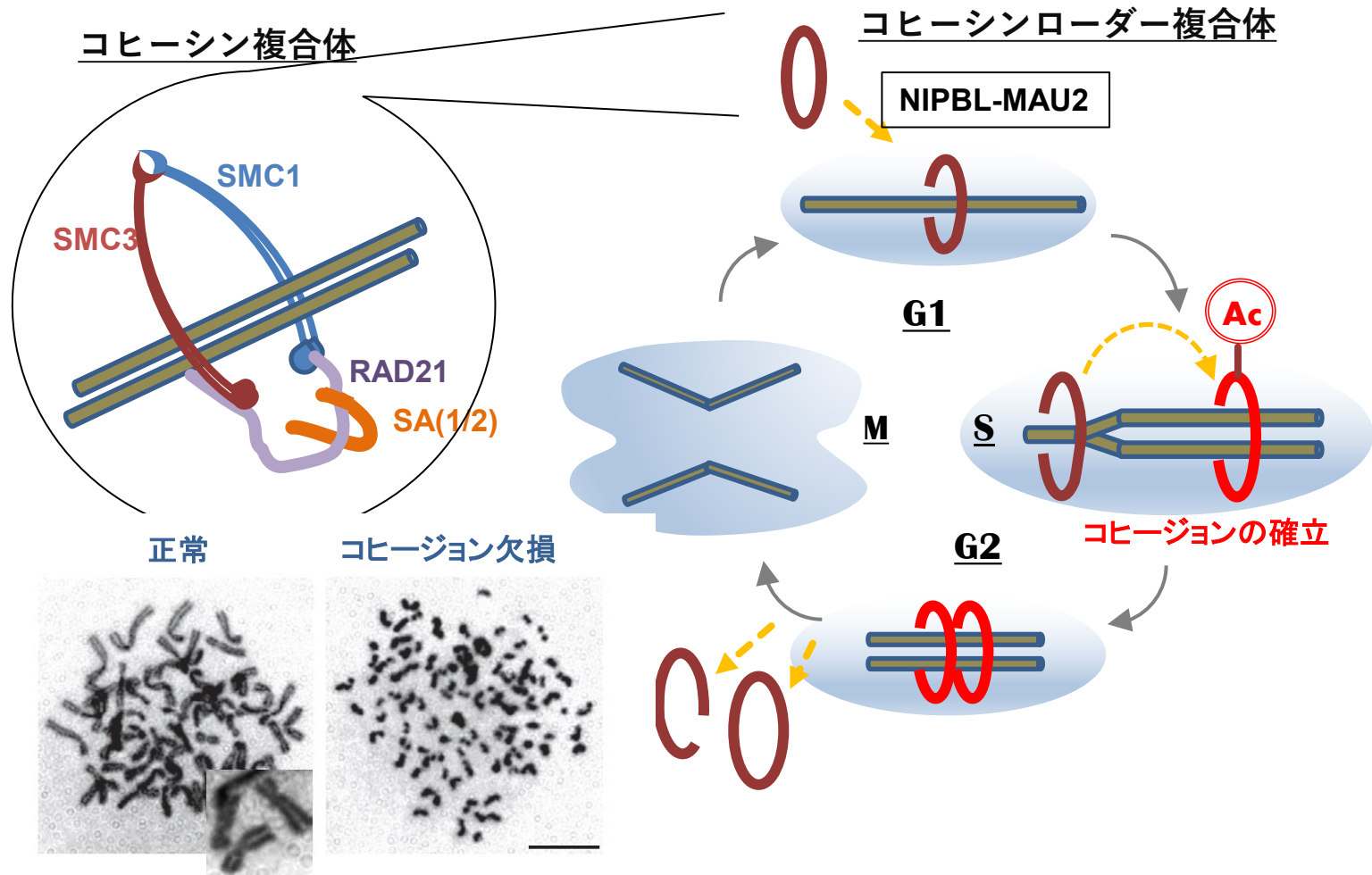
稀少疾患研究の意味



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



コヒーシンと姉妹染色分体間接着（コヒージョン）機能



コヒーシンの転写制御への関与は30年来の謎

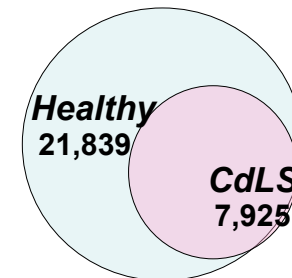
コルネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS)

- 原因遺伝子の70%はコヒーシンローダーNIPBL遺伝子、20%がSMC1A, SMC3, RAD21などのコヒーシン構成遺伝子
- 特徴的な顔貌、小頭症、臓器不全や身体的成長不全
精神的発達遅延等の病態
- コヒーシンの染色体局在の減少
- コヒージョン欠損はみられない
- コヒーシン結合サイト付近の遺伝子の発現異常



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

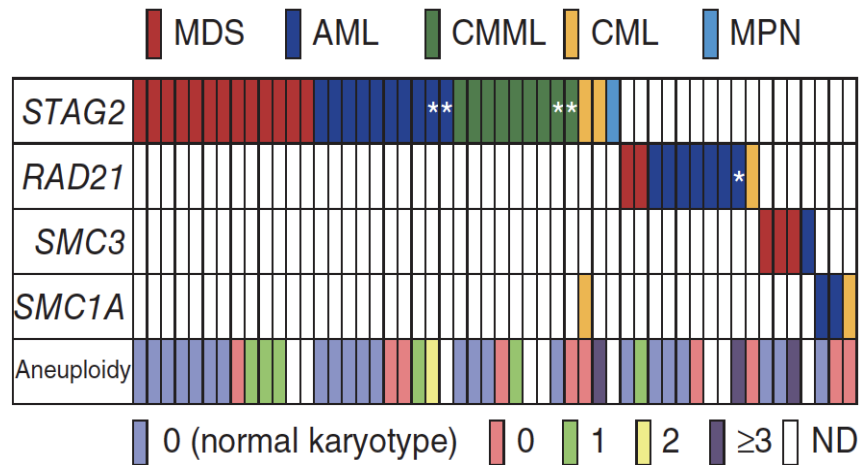
ChIP-chip; コヒーシン (RAD21)



(PLOS Biol., 2009)

胎児期での細胞分化における転写調節の異常？

骨髄系腫瘍(myeloid neoplasms)では有意にコヒーシに変異が見つかる

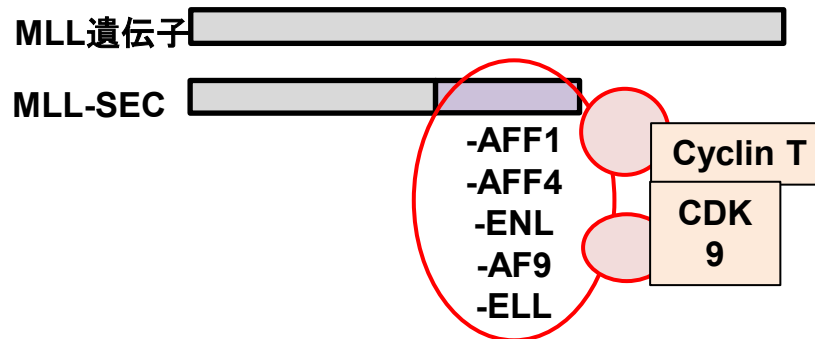


MDS: myelodysplastic syndromes
 AML: acute myeloid leukemia
 CMML: chronic myelomonocytic leukemia
 CML: chronic myelogenous leukemia
 MPN: myeloproliferative neoplasms

-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



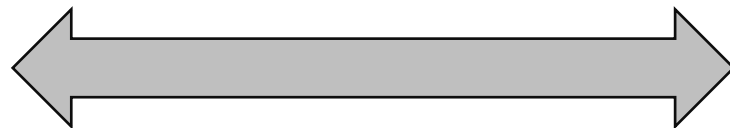
- 実験あたりデータ量の縮小による実験回転率の向上

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

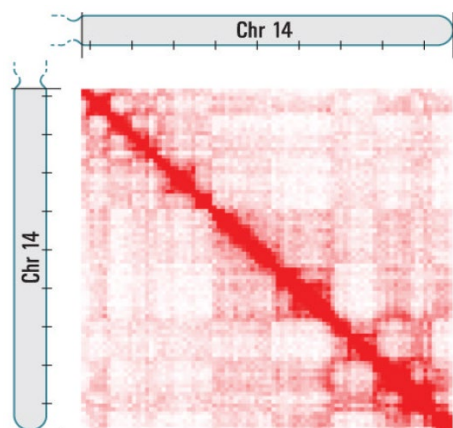
- サンプル調製によるミスの低減、操作性の向上

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

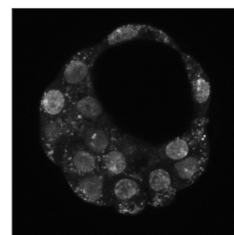
染色体
(1-10 μm)
 10^7 - 10^8 塩基対

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

生体イメージング

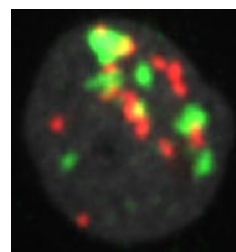
透明化



光学顕微鏡

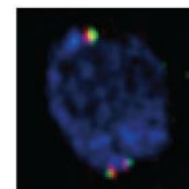
生細胞イメージング

ゲノム可視化



超解像顕微鏡

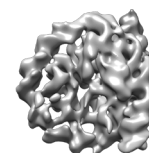
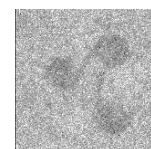
蛋白質機能・修飾



蛋白質間相互作用

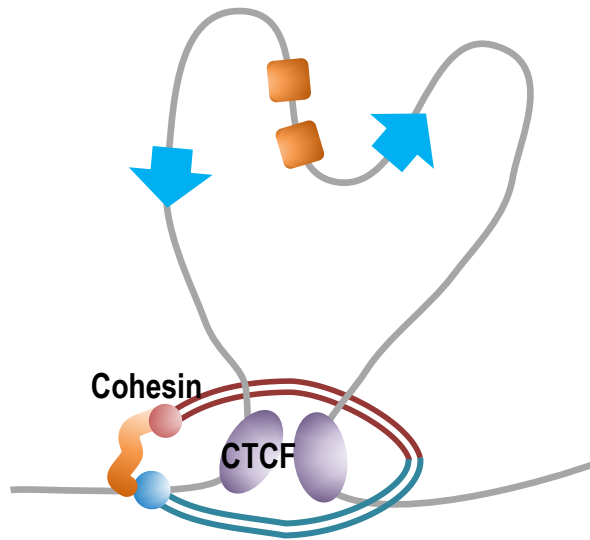
クライオ電顕

分子複合体構造



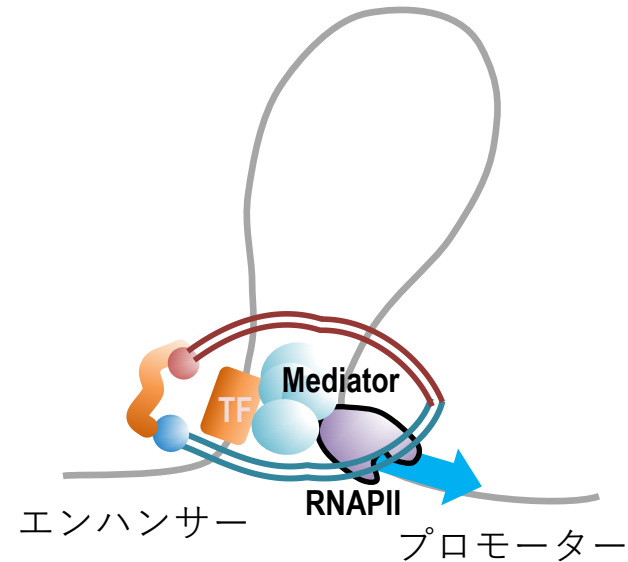
コヒーシオンが転写を制御するメカニズムとは？

コヒーシ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)

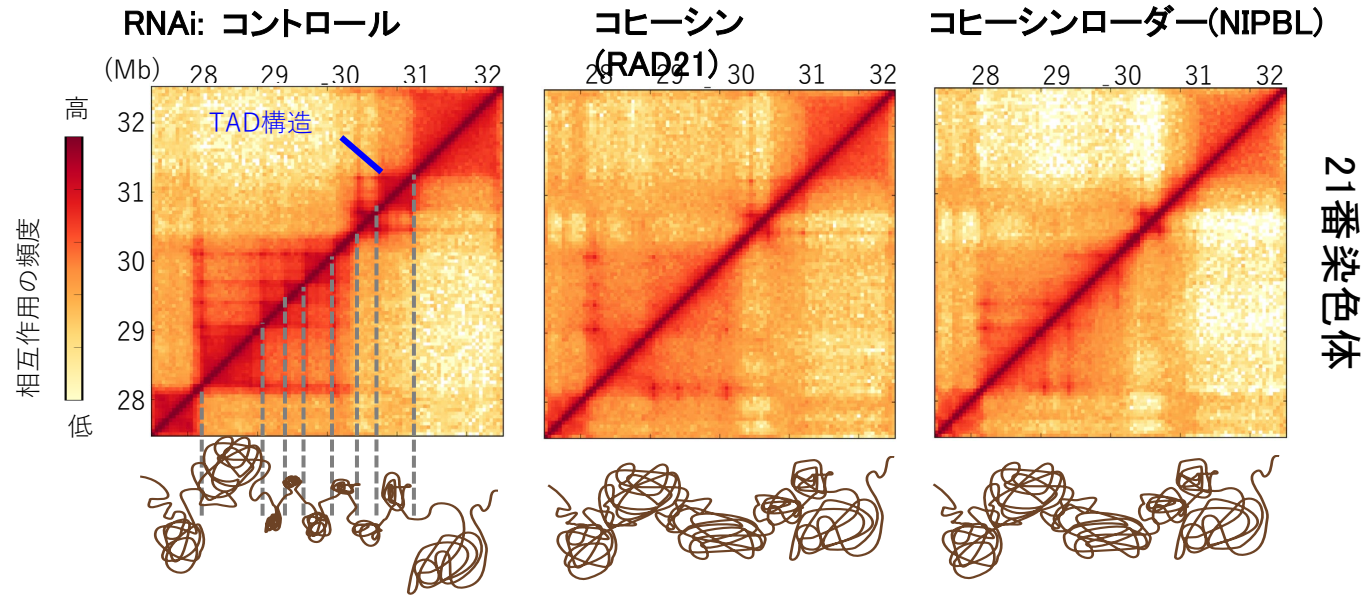


エンハンサー/プロモーターループ構造

(Kagey et al, Nature., 2010)

コヒーシとコヒーシンローダーはTAD構造の形成に必須

RPE培養細胞



ゲノム全体のTAD数: 3325ヶ所

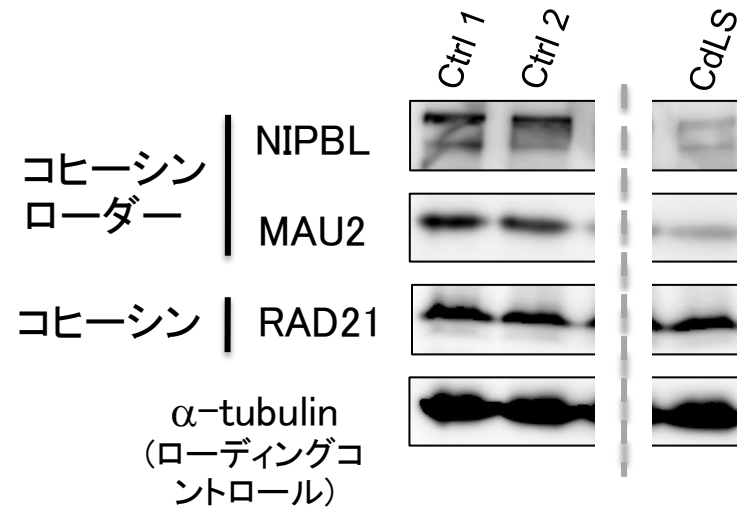
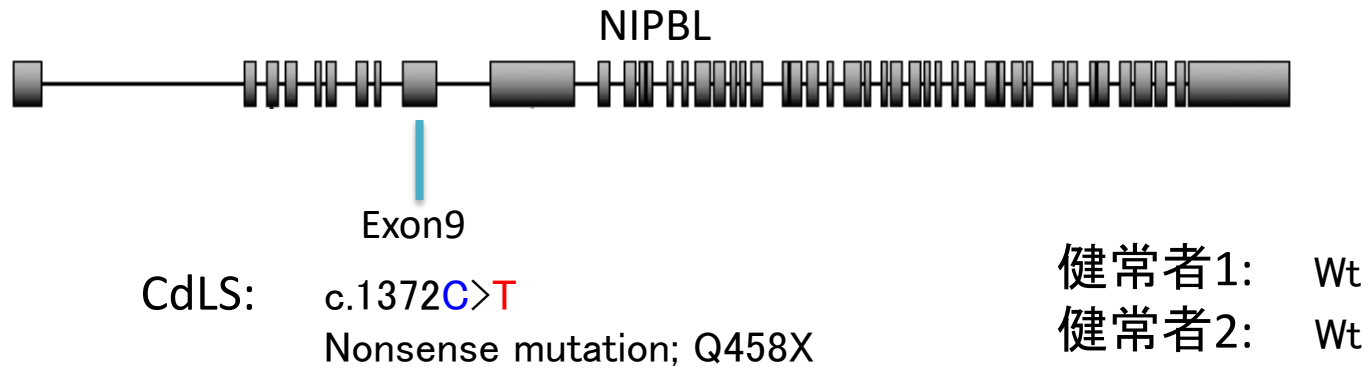
64ヶ所

28ヶ所

CdLS患者細胞ではTADに変化は見られるのか？

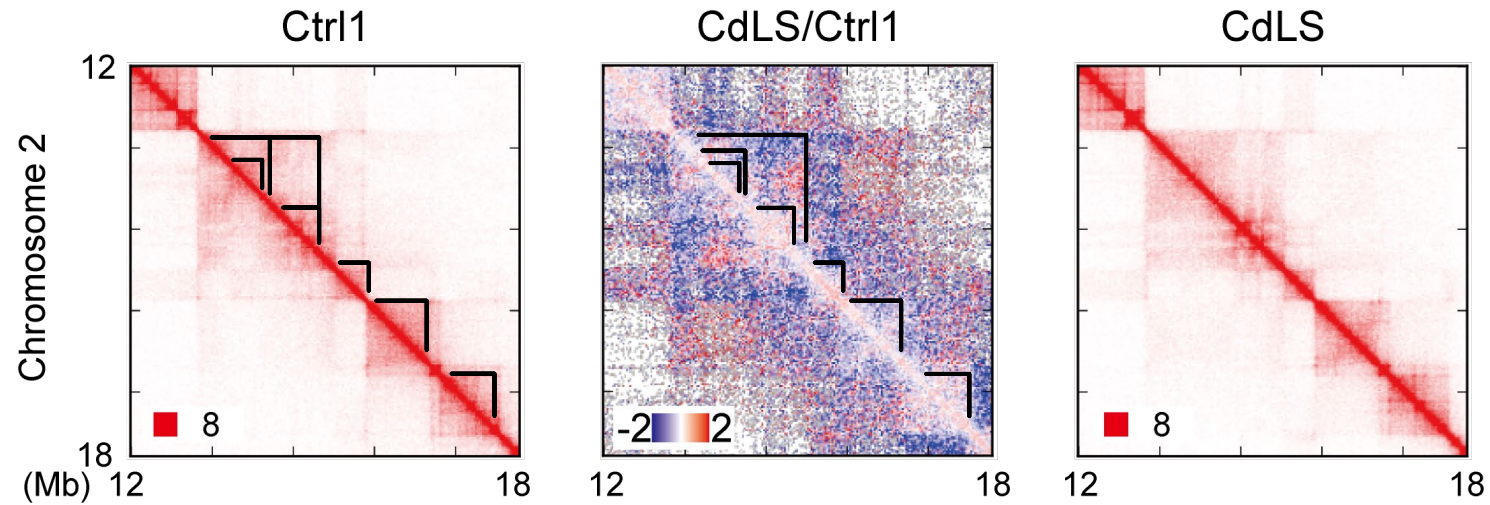
(Sakata ,unpublished
)

CdLS患者由来細胞におけるHi-C解析



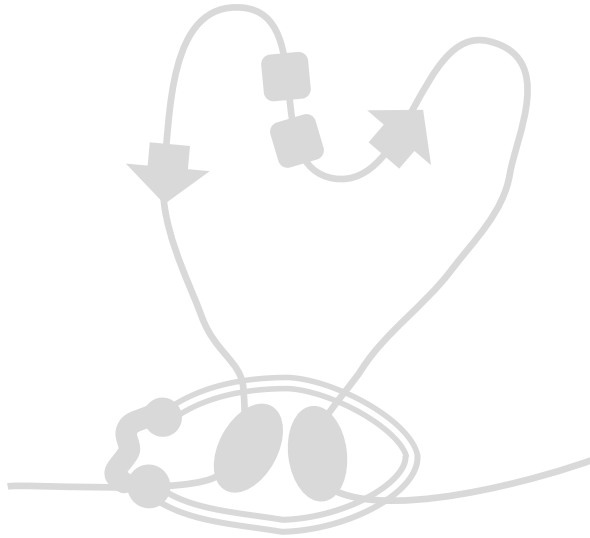
(Sakata ,unpublished
)

CdLSではTAD構造が維持されている

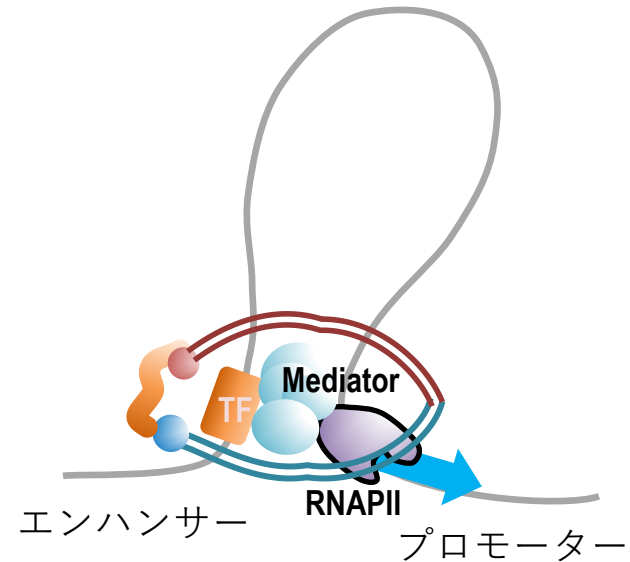


(Sakata ,unpublished
)

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

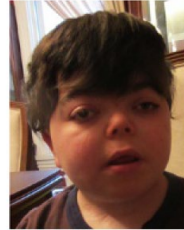
(Kagey et al, Nature., 2010)

CdLSに類似したCHOP症候群の発見

CHOPS患者



T254S



T254A



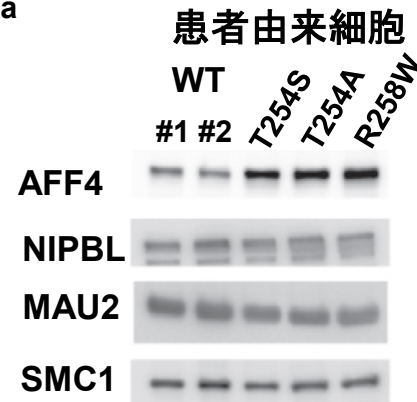
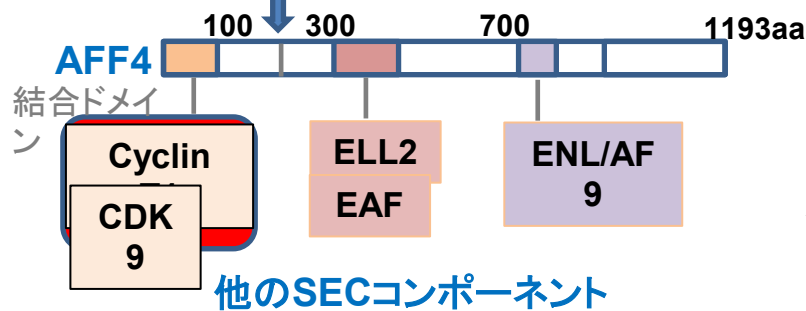
R258W



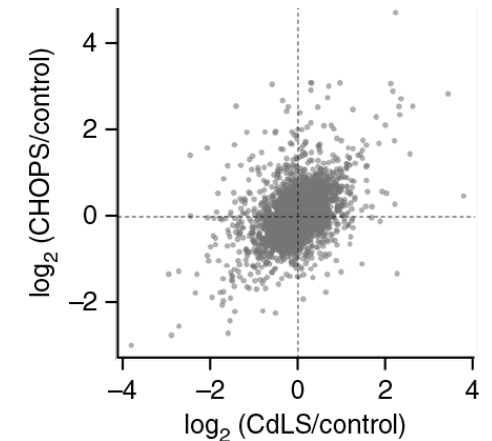
Super Elongation Complex(SEC)

T254/R258 Missense mutations

⇒ AFF4 の増加



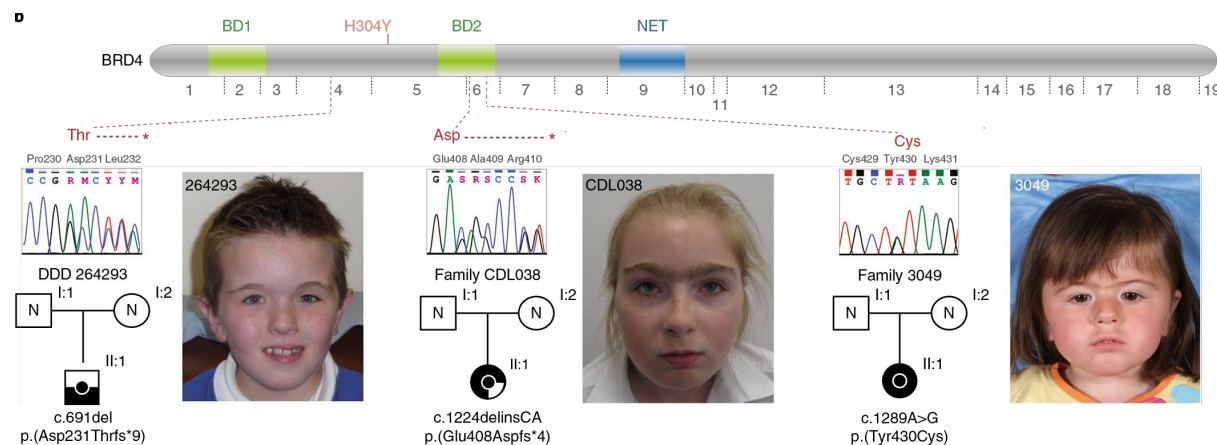
CdLSと類似の転写プロファイル



(Nature genet., 2015)

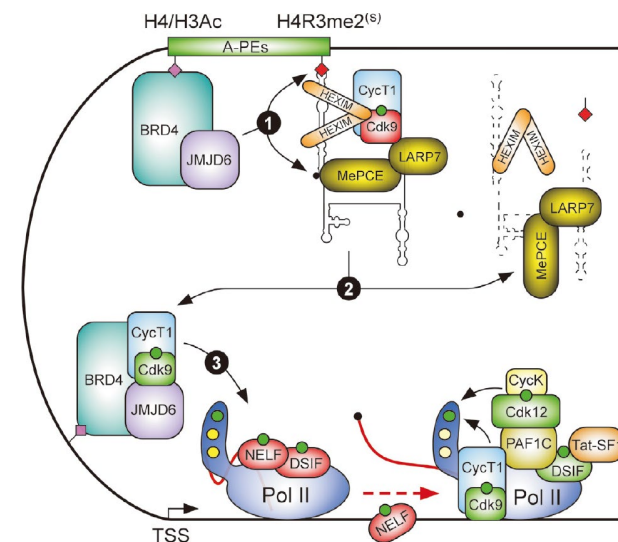
- CdLSの病態と類似
- 遺伝子発現変動プロファイルの類似
- コヒーシンローダーの染色体局在の減少
- コヒーシンとAFF4を含む転写複合体の相互作用

CdLSの新たな原因遺伝子BRD4の同定



(Olley et al., 2018)

- 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エンハンサー(SE)でコヒーシンローダーと共局在している

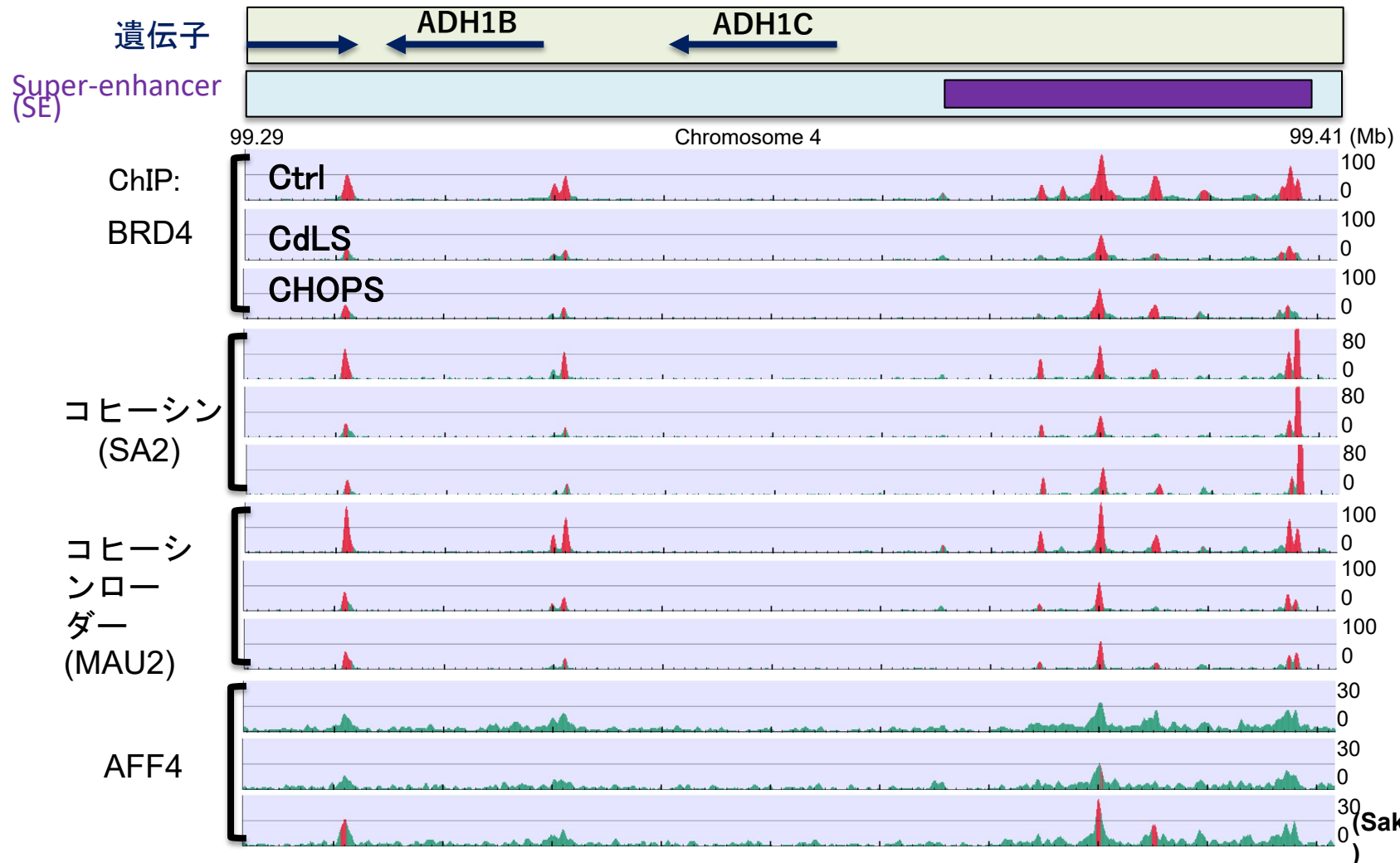


(Quaresma et al., 2016)

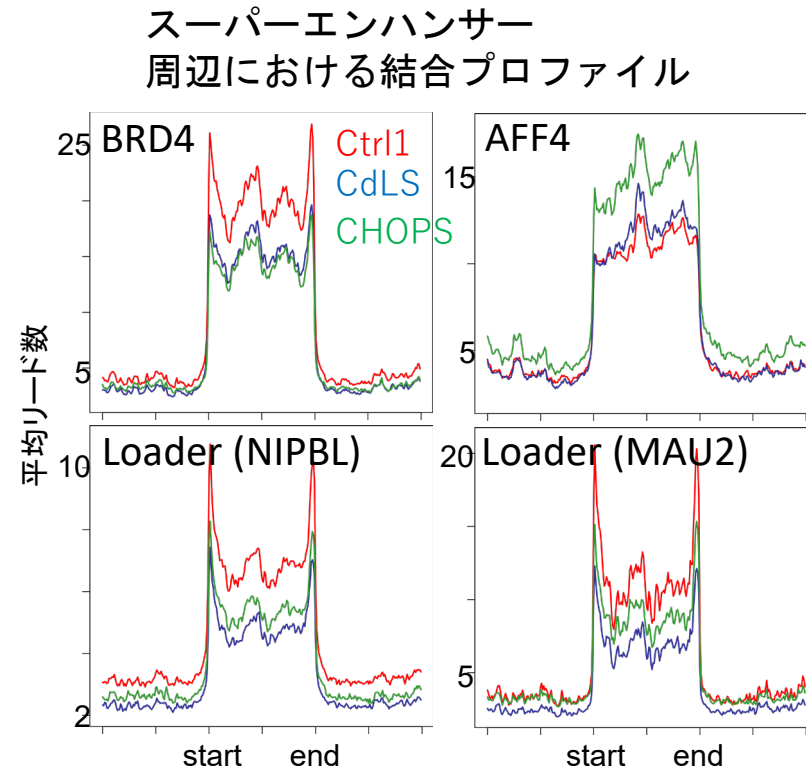
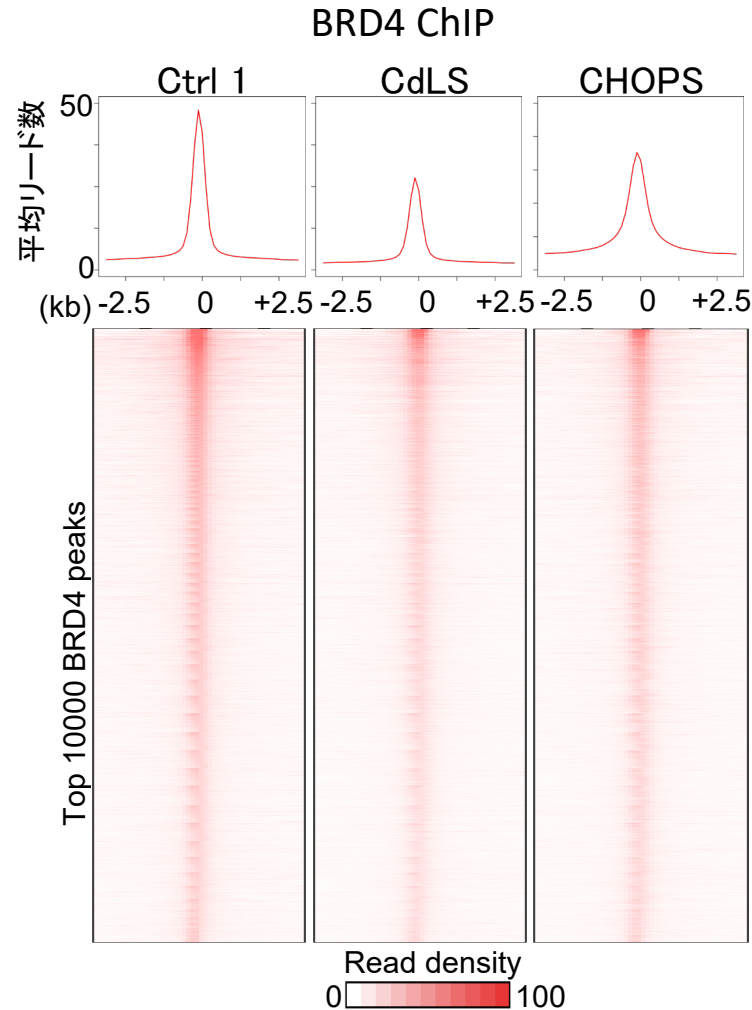
BRD4の機能

- 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エンハンサーに局在
- 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



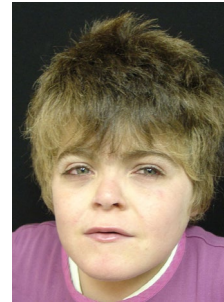
(Sakata ,unpublished
)

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



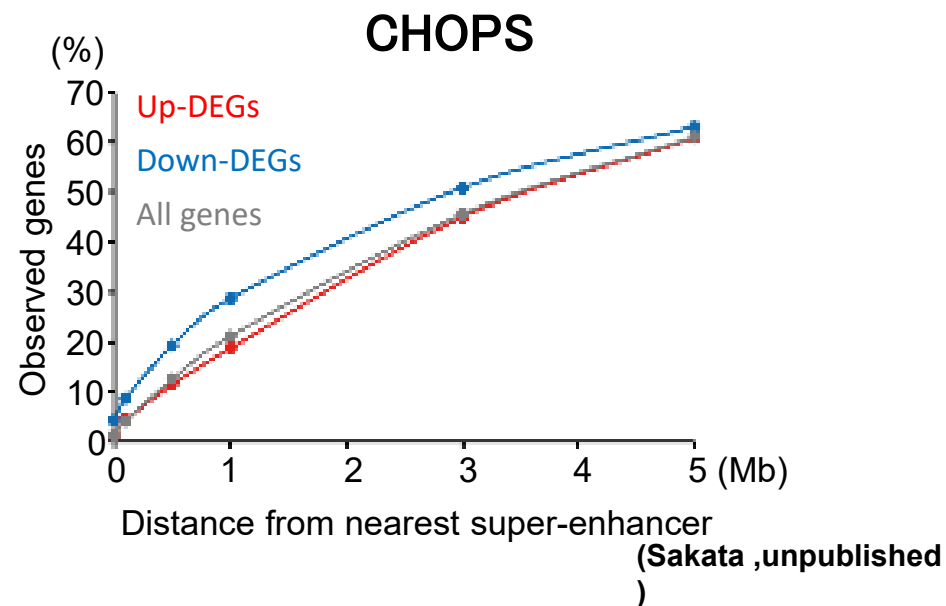
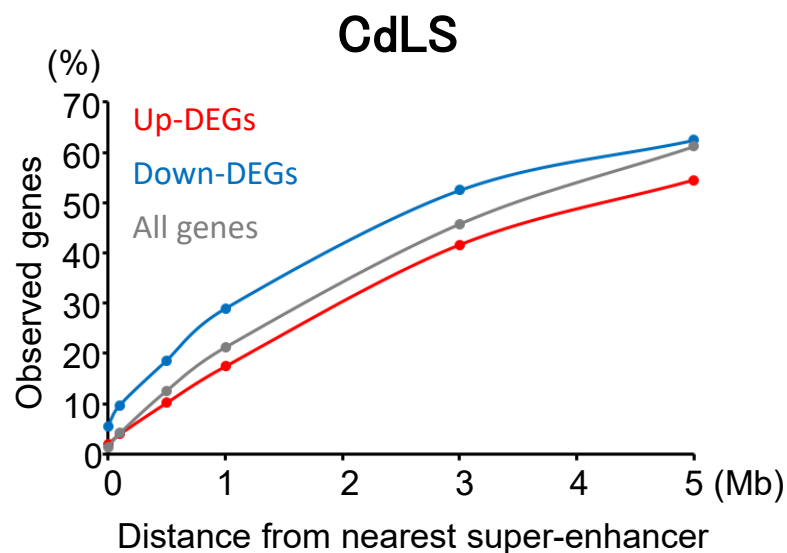
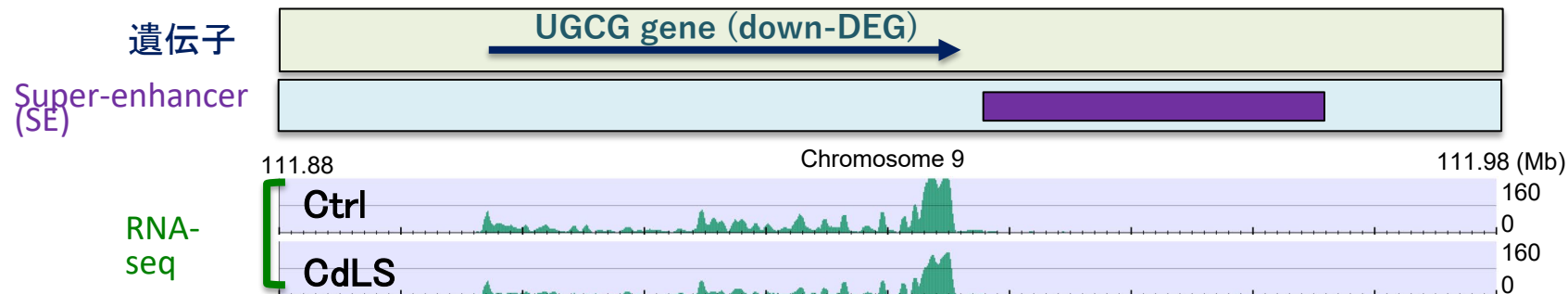
CHOPS



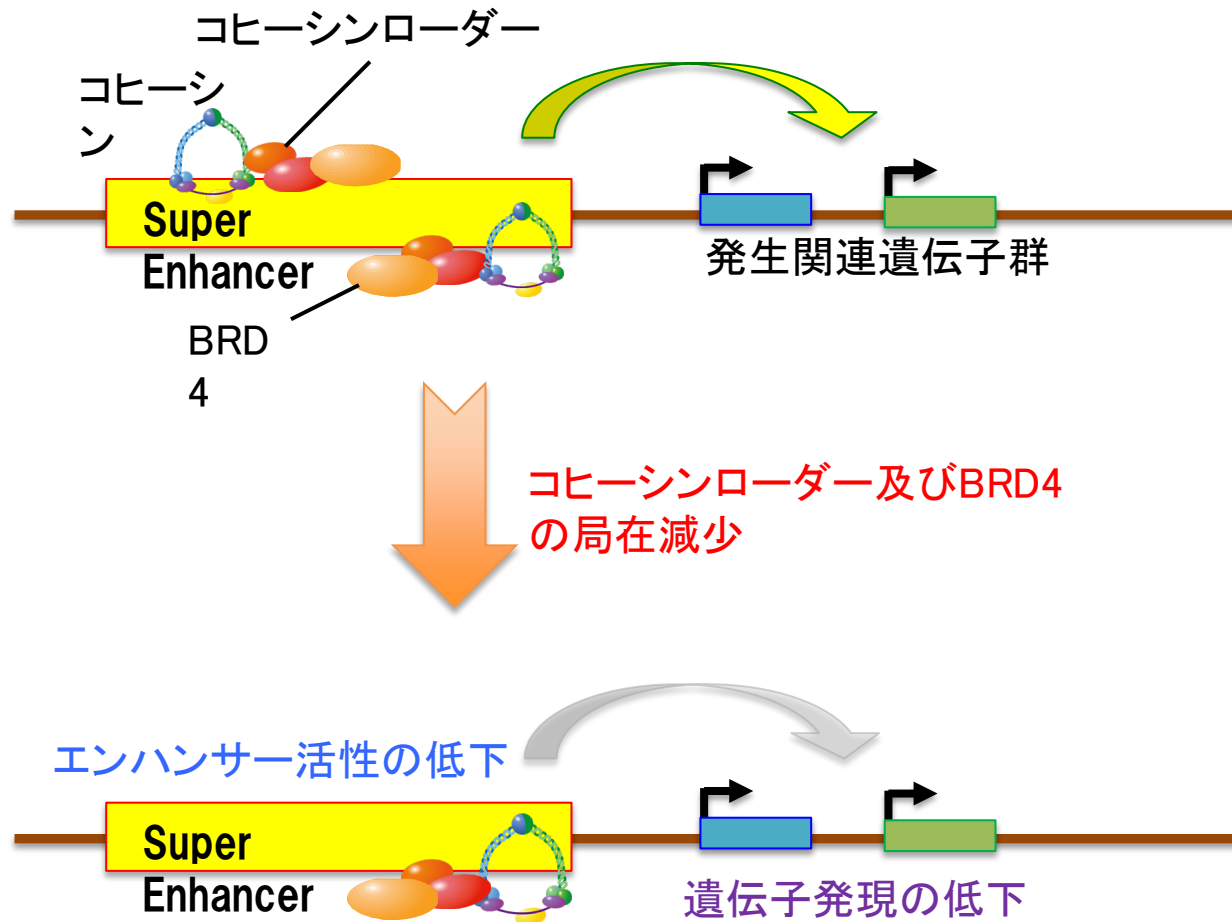
CdLS

AFF4	-	↑	N.D.	
Cohesin Loader	↓	↓	N.D.	⇒ 少なくとも培養細胞では BRD4の欠損でコヒーシ ンローダーが減少
BRD4	↓	↓	↓	

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

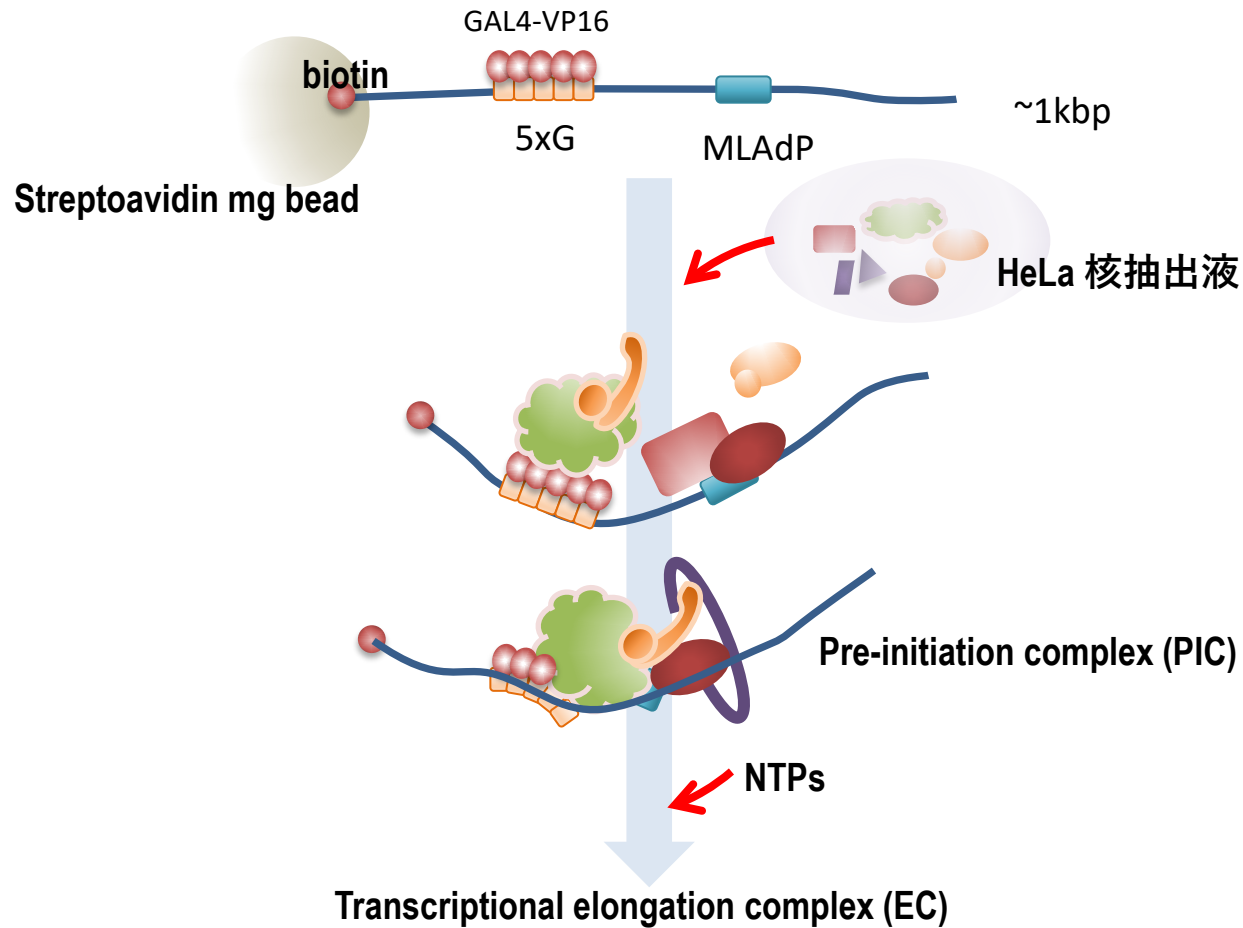


CdLS及びCHOPSにおいて遺伝子制御異常が引き起こされるメカニズムのモデル



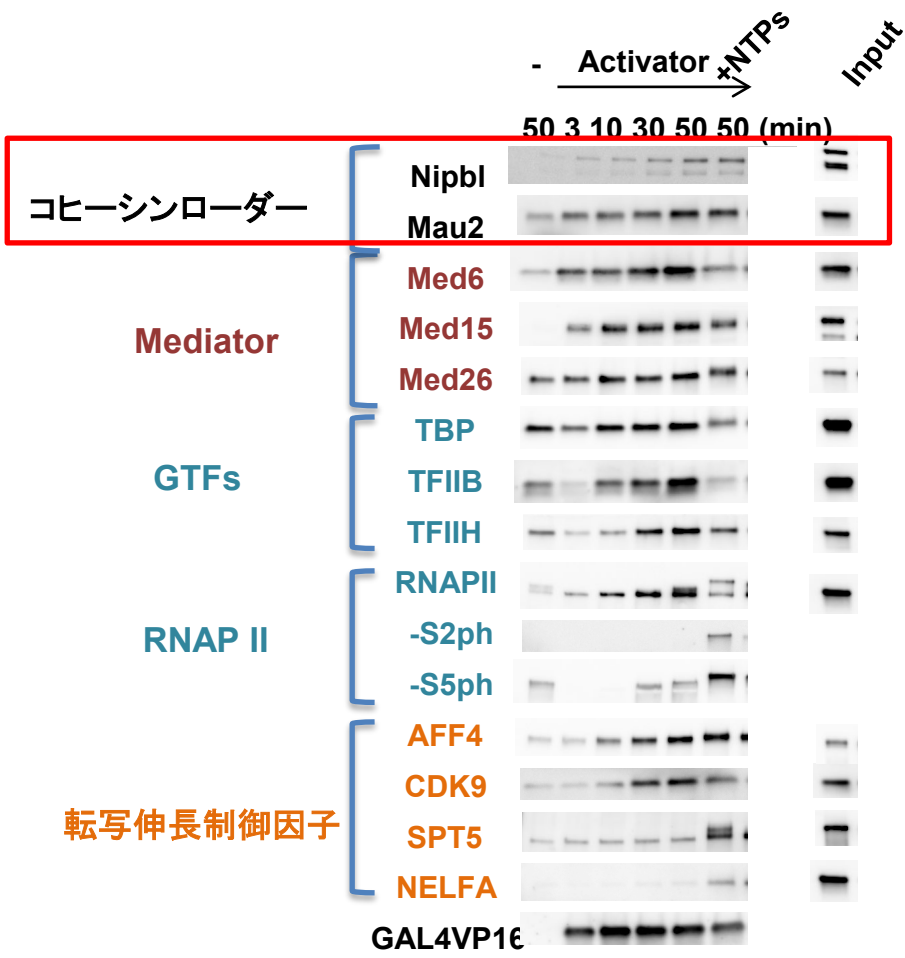
コヒーシンのローダーがエンハンサー及び
プロモーターの活性を制御するメカニズムとは？

In vitro アッセイ 転写開始及び転写伸長複合体の形成



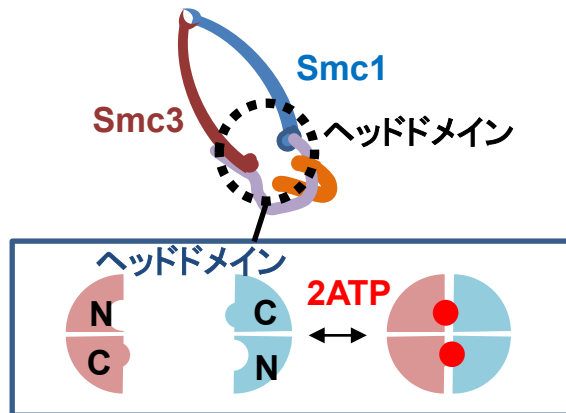
(Lin et al., Curr Protoc Mol Biol. 2012)

コヒーシンローダー 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

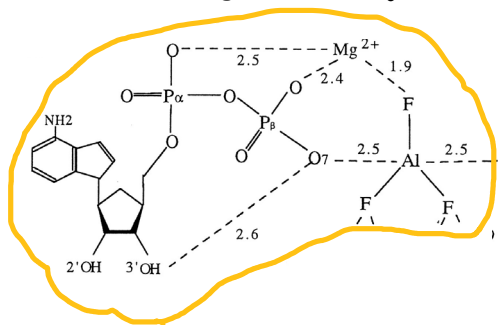


コヒーシンの結合は
検出されない

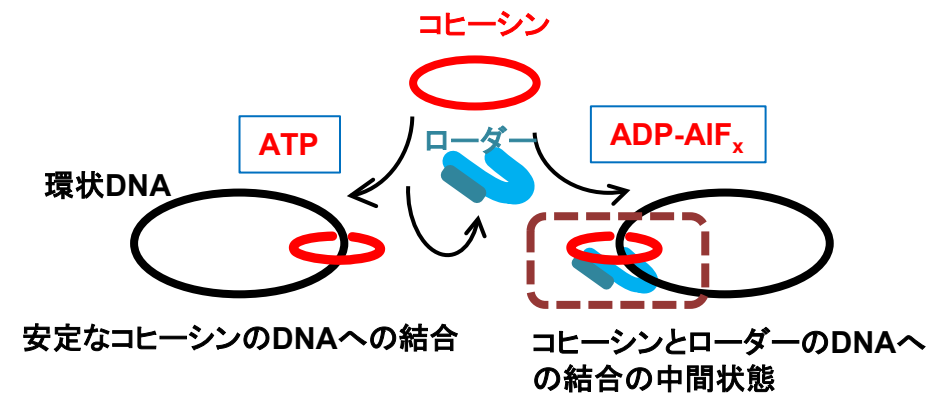
ATPアナログ(ADP-AIF_3) はコヒーシンとローダー及びDNAの結合を安定化させる



ATP analogue; ADP-AIF_3

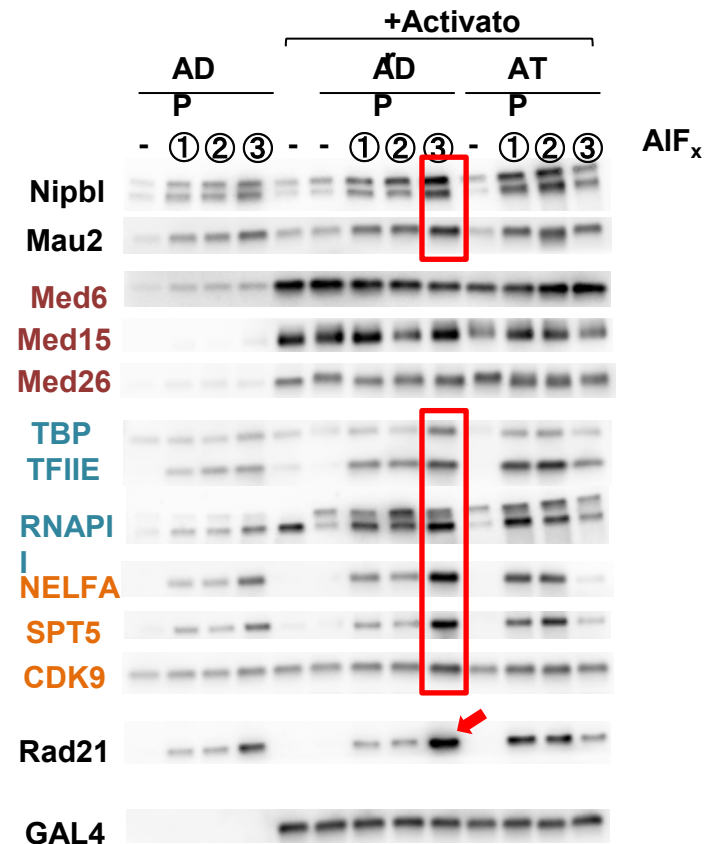
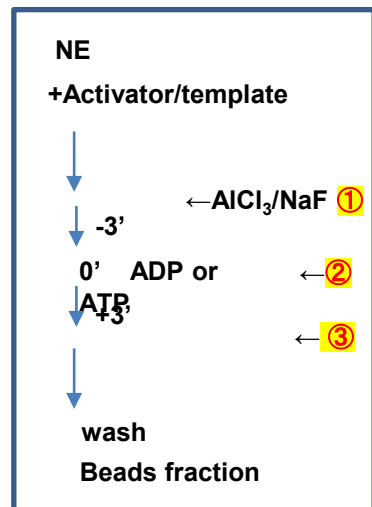
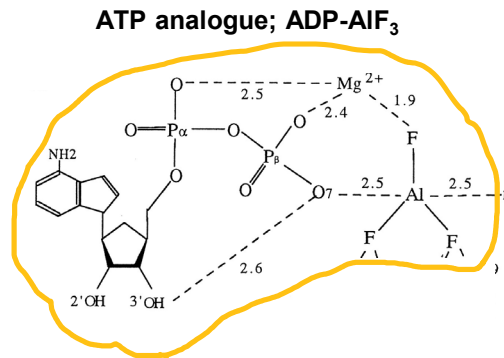


In vitro cohesin loading assay

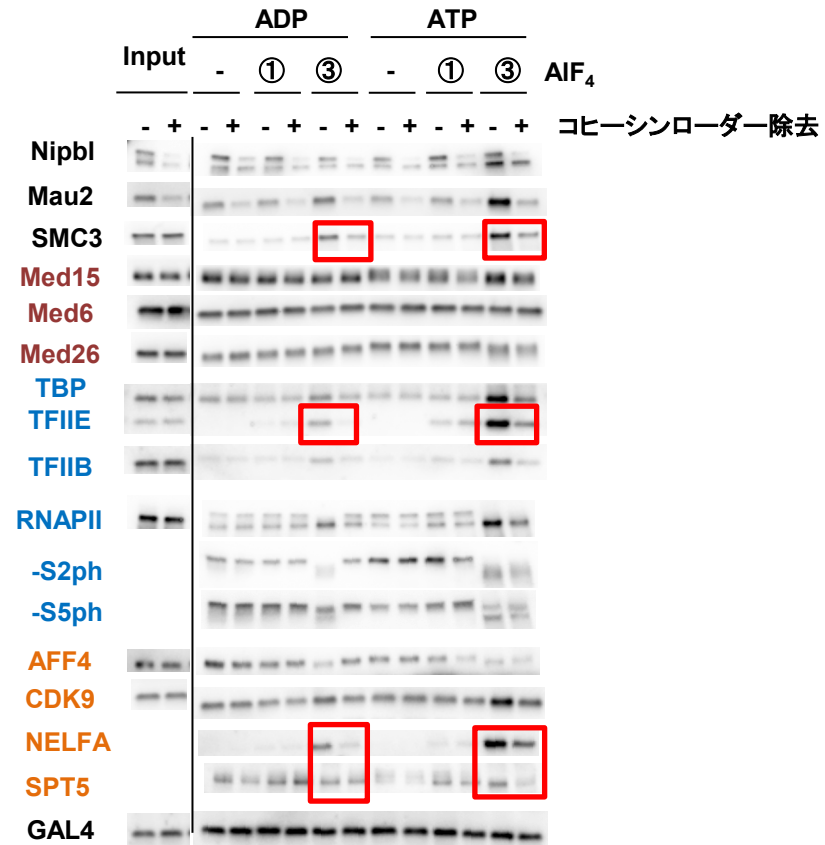
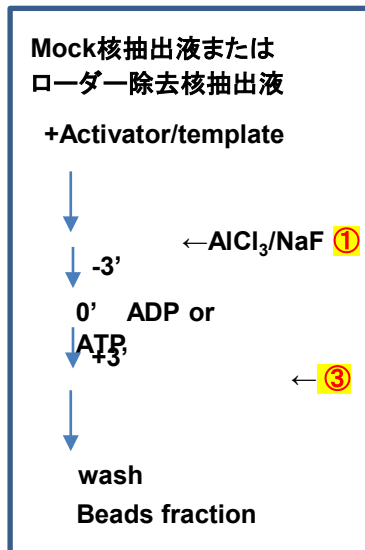


(Murayama et al., Nature 2014 ,
Çamdere et al., PNAS 2018, Minamino et al., Life Science Alliance 2018)

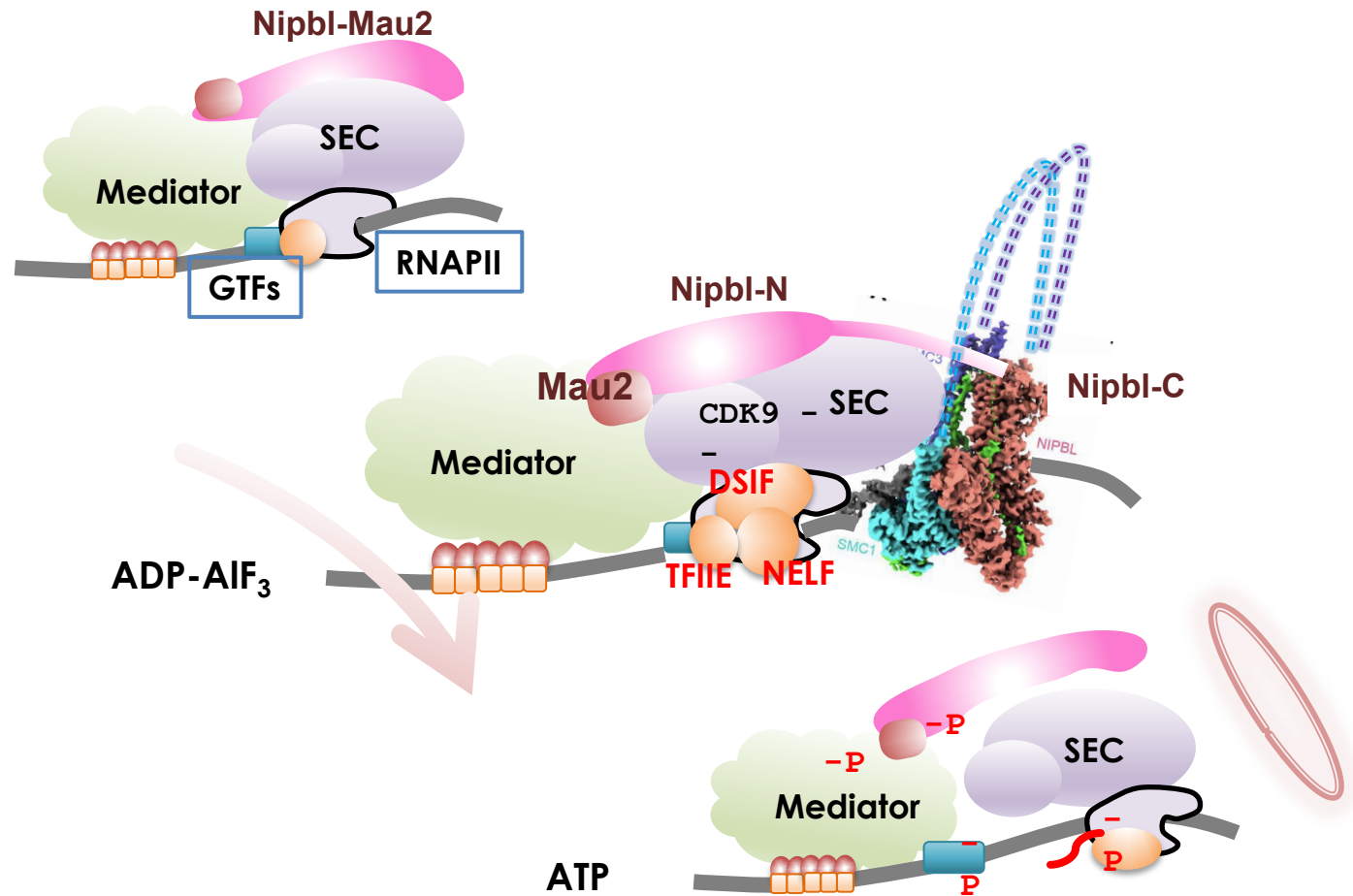
ATPアナログ(ADP-AIF₃) がPIC形成と伸長因子のリクルートを促進する



ATPアナログの効果はコヒーシンローダーに依存する



Bando, unpublished



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