

# 研究報告書

## 「コヒーシンによるクロマチン構造変換の可視化と制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 4 月～平成 27 年 3 月

研究者: 西山 朋子

### 1. 研究のねらい

真核生物において、複製されたゲノムを娘細胞に均等に分配するためには、姉妹染色分体間の接着が必須である。この接着を担うコヒーシン複合体(以下コヒーシン)は、ATP 加水分解酵素である Smc1 と Smc3、kleisin サブユニットの Scc1、Scc1 に結合する SA1/2 のヘテロ四量体から形成されるリング状の複合体である。コヒーシンは、その DNA 上でのダイナミクスが接着の確立や解離と密接に関係している。コヒーシンは分裂終期から G1 期にかけてクロマチン上に結合してくるが、この時期の結合はダイナミックなものである。その後 DNA 複製の進行に伴って、コヒーシンとクロマチンとの結合が安定化し、それにより姉妹染色分体間の接着が確立し、分裂期に至るまで姉妹染色分体同士を繋ぎ止めていることが分かっている。しかしながら、コヒーシンのリング構造が DNA 複製の進行に伴って、いつ、どこで、どのように 2 本の姉妹染色分体を接着するようになるのか、またその接着が分裂期においてどのように解離するのか、その詳細は未だに不明である。

また近年の研究から、コヒーシンの転写制御因子としての役割が明らかにされつつある。たとえばコヒーシンは insulator タンパク質 CTCF とゲノム上で共局在し、その insulator 機能に必要である。またコヒーシンやその結合因子の変異による遺伝性疾患 Cornelia de Lange syndrome (CdLS) においては、接着が正常であるにも拘わらず形態形成異常が見られ、コヒーシンが発生に重要な因子の転写制御に関わっている可能性が示唆されている。コヒーシンによる転写制御にはコヒーシン依存的な DNA ループの形成が重要であるという仮説が存在するが、未だその実証はなされておらず、メカニズムは明らかになっていない。

本研究では、(A)細胞レベルにおける接着確立・解除のメカニズムをコヒーシンダイナミクス制御に着目して明らかにすること、次に(B)コヒーシンの一分子レベルでのダイナミクスを明らかにすることで、コヒーシンがクロマチン構造、延いては遺伝子発現を制御するメカニズムの解明を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究ではまず、細胞レベルにおける接着確立・解除のメカニズム解明に着手した。脊椎動物においては、コヒーシンの DNA 上でのダイナミクスは細胞周期に応じて多段的に制御されており、たとえば分裂終期から G1 期にかけて DNA 上にリクルートされるコヒーシンは、ダイナミックに DNA との結合と解離を繰り返すのに対し、G2 期のコヒーシンは安定して DNA に結合する。このことは S 期の間に接着が確立することを示唆している。コヒーシン結合因子のひとつで、接着の確立に必須の Sororin は、近年の我々の研究から、DNA 複製依存的にコヒー

シンに結合し、コヒーシン解離因子である Wapl の作用に拮抗することでコヒーシンと DNA との結合を安定化し、S 期における接着の確立に寄与することが明らかになった。一方、一度確立された接着は、分裂期において二段階の解離制御、即ち(1)分裂前期における染色体腕部の接着解離(prophase pathway)および(2)分裂中期におけるセントロメア領域のコヒーシン切断(separate pathway)をうける。我々は、Sororin 依存的に確立された接着が、分裂期において、どのような時間的・空間的制御をうけて解消されるのか、そのメカニズムを解明するため、ヒト体細胞およびアフリカツメガエル卵抽出液を用いて解析を行った。その結果、Sororin は分裂期において複数箇所でのリン酸化を受け、このリン酸化により、Pds5 を介した Sororin とコヒーシンとの結合が分裂期特異的に失われること、Sororin の非リン酸化型変異体が分裂期においてもコヒーシンおよびクロマチンとの結合を維持することが明らかになった。非リン酸化型変異体 Sororin は分裂中期に至るまで染色体腕上に局在し続け、その結果、染色体腕部の過度の接着および分裂後期における染色体の不分離を引き起こすことが分かった。さらに *in vivo* の解析から、Sororin のリン酸化による染色体からの解離には Aurora B が必須であり、この経路は、従来 prophase pathway に必要であることが知られていた Plk1 依存的なコヒーシンの解離とは独立した経路であることが明らかになった。

さらに本研究では、コヒーシンの一分子レベルでのダイナミクスからコヒーシン機能を明らかにするため、コヒーシン一分子観察系の構築を行い、コヒーシンの挙動を一分子レベルで観察する系を確立した。

## (2) 詳細

### ● 研究テーマ(A)「細胞レベルにおける接着解除メカニズムの解明」

分裂期におけるコヒーシンダイナミクスを細胞レベルで理解するため、ヒト体細胞において Sororin に着目し、分裂期染色体腕部の接着が解消されるメカニズムの解明に取り組んだ。質量分析の結果、Sororin は分裂期において複数箇所でのリン酸化を受け、このリン酸化により Sororin とコヒーシンとの結合が分裂期特異的に失われること、Sororin の非リン酸化型変異体 (Sor-11A) が分裂期においてもコヒーシンおよびクロマチンとの結合を維持することが明らかになった。Sor-11A 発現細胞では染色体腕部の過度の接着および分裂後期における染色体の不分離が引き起こされた(図 1)。一方、ツメガエル卵抽出液中で、恒常的リン酸化状態を模した変異体 Sor-11E のクロマチンへの結合を調べたところ、間期においてクロマチンに結合できるが、その結合安定性が野生型に比べて低いことが分かった。さらに *in vivo* の解析から、Sororin のリン酸化によるコヒーシンからの解離および染色体からの解離には、Aurora B が必須であることが明らかになった。以上のことから、Sororin のリン酸化が分裂期におけるコヒーシンの不安定化と接着解離に重要な役割を担っていることが明らかとなり、その成果を発表した(Nishiyama et al., 2013)。研究テーマ(A)については当初の研究目標を達成できた。

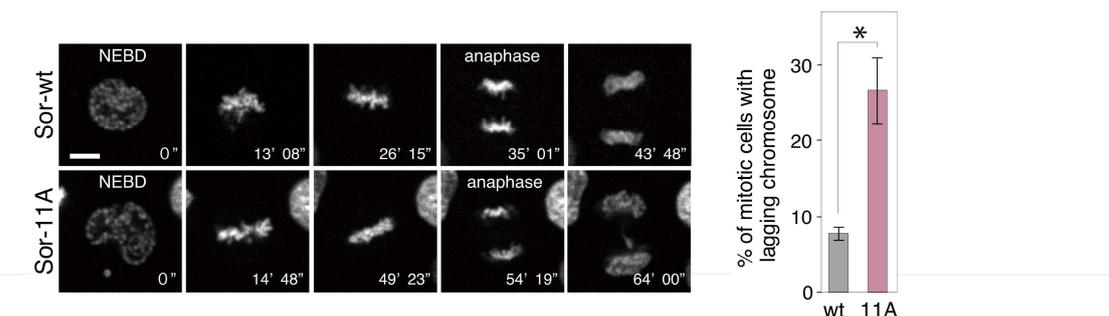


図 1 Sororin 非リン酸化型変異体 (Sor-11A) 発現細胞の分裂期進行と染色体分配異常

### ●研究テーマ(B)「コヒーシシー分子観察系の構築」

従来の細胞レベルまたは生化学的な解析では、コヒーシンのダイナミクスを分子集団としてしか捉えることができなかった。そこで本研究では、コヒーシンのダイナミクスと DNA の状態を一分子レベルの解像度で解析するため、全反射顕微鏡を用いたコヒーシシー分子観察系の構築に取り組んだ。

コヒーシン複合体は、MultiBac 及び昆虫細胞発現系を用い、FLAG タグと His タグを利用した 2 段階精製法により、純度の高いコヒーシン複合体を精製することに成功した。蛍光観察のため、コヒーシン Scc1 サブユニットの C 末端に Halo タグを付加し、種々の蛍光色素が結合した Halo タグリガンドで標識した。またコヒーシンが結合するターゲットとなる DNA は、約 50kbp のバクテリオファージ  $\lambda$  由来の DNA を用い、この両端あるいは一端をビオチン化し、Streptavidin コートしたガラス基板上に結合させた(図 2)。ガラス基板上に幅 1 mm 長さ 17 mm 厚さ 100  $\mu$ m のチャンネルを設計し、溶液に任意の流速を与えながら DNA を基板上に結合させたり、蛍光標識タンパク質や細胞抽出液を連続的に導入できるようにした(図 2)。

この系を用いてガラス基板上に直鎖 DNA の両端を結合させた状態で蛍光標識したコヒーシン分子を導入したところ、DNA にコヒーシンが結合する様子が観察できた。更に詳細な解析から、コヒーシンが DNA 上で、ATP 加水分解活性に依存しない一次元自由拡散運動を示すことが明らかになった。興味深いことに、コヒーシンとゲノム上で共局在することが知られている CTCF を DNA の端に結合させると、コヒーシンは CTCF 部位に蓄積し、拡散運動を停止した。この結果は、ゲノム上で CTCF とコヒーシンが共局在するという過去の報告を支持している。以上、コヒーシンの一分子観察系の確立と、それを用いたコヒーシンの運動性の観察、および他のクロマチン結合タンパク質との相互関係を観察することができるようになり、研究テーマ(B)については目標を達成できた。

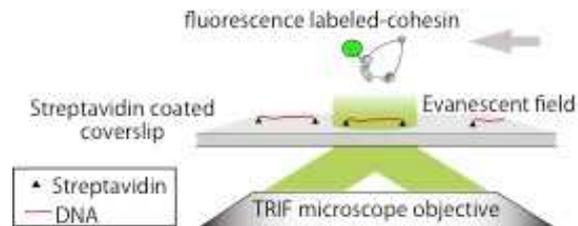


図 2 全反射顕微鏡を用いたコヒーシシー分子観察系

### 3. 今後の展開

本研究で確立したコヒーシシー分子観察系は、これまで細胞生物学的、生化学的に解析または推測されてきたコヒーシンの動態および機能に、より高いレベルの解像度で直接的な解答を与えるものである。現在、DNA 複製をリアルタイムでモニターする系を開発中であり、DNA 複製の進行と共に接着が確立する瞬間を捉えることを目指している。リアルタイムで複製をモニターすることで、従来、接着確立への必要性が示唆されてきた因子が、具体的にいつ、何処でその役割を果たしているのかを知ることが出来る。また DNA 複製のみならず、DNA 上で転写を誘起することで、コヒーシンの転写制御における機能を一分子レベルで理解することも可能となる。

本研究を応用し、一分子の解像度を維持しながら、より細胞内環境に近い状態を再現することで、コヒーシだけでなく、種々のクロマチン関連因子の *semi-vivo* 高解像度観察が可能になると期待される。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

###### (研究者)

当初の研究目標は、コヒーシダイナミクスを細胞レベルおよび一分子レベルで理解すること、そしてコヒーシによるクロマチン構造変換を可視化することでコヒーシが遺伝子発現を制御するメカニズムを明らかにすることであった。前者のコヒーシダイナミクスの細胞レベルでの理解については、当初の目標を達成できた。後者の一分子レベルでの観察系については、系を構築するという目標は達成できたが、クロマチン構造変換の可視化については、当初想定していた単純な条件ではコヒーシ依存的なクロマチンループの形成を観察できないことが明らかになり、今後更なる検討が必要である。一方、この研究過程で、コヒーシが DNA 上でダイナミックに位置を変える性質があるという新しい発見があり、この性質とコヒーシ機能における重要性は、今後明らかにすべき課題の一つである。

研究の遂行は研究者本人が行い、動物飼育管理やタンパク質精製など、必要に応じて技術補佐員の援助を受ける体制で、研究の遂行には支障を来すことなく、適切であったと考えている。研究費執行状況についても、購入した大型備品等はいずれも研究に不可欠なものであり、適切な執行であったと考えている。

本研究においてコヒーシ一分子のダイナミクスを明らかにする系を開発し、コヒーシ病と呼ばれる種々の遺伝性疾患の原因変異の性質を解析する系を構築したことで、今後、これらの遺伝性疾患の病因究明に対して多くの基礎的知見を提供するとともに、一分子レベルでの解析で得られた知見が、将来の治療薬開発を加速するものと期待している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

###### (研究総括)

分裂期における接着解離のメカニズムは西山氏の長年のテーマである。接着を担うコヒーシ複合体の転写制御に焦点を当て研究を進めている。ここではその機能を明らかにするために *in vitro* 系で再構築・可視化しその実証をめざしている。1分子イメージングにより、ATP加水分解活性に依存しないコヒーシがDNAに結合し、DNA上を自由拡散運動すること、CTCFをDNAの端に結合させるとコヒーシはCTCF部位に蓄積し、拡散運動を停止することを見出した。コヒーシの一分子観察系の確立と、それを用いたコヒーシの運動性の観察、および他のクロマチン結合タンパク質との相互作用が観察できるようになった。チャレンジングなテーマであり、成果を上げつつある。今後転写制御への寄与、DNA複製系の確立、コヒーシ病の原因解明など、この系を使って独創的な研究を展開されることを期待する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. **Nishiyama T(\*)**, Sykora MM, Huis In 't Veld PJ, Mechtler K, Peters JM. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110, 13404–9 (2013). (\*責任著者)
2. Tedeschi A, Wutz G, Huet S, Jaritz M, Wuensche A, Schirghuber E, Davidson IF, Tang W, Cisneros DA, Bhaskara V, **Nishiyama T**, Vaziri A, Wutz A, Ellenberg J and Peters JM. Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation *Nature* 501, 564–8 (2013).
3. Peters JM, **Nishiyama T**. Sister Chromatid Cohesion. “DNA replication” (eds Stephen D. Bell, Marcel Méchali, and Melvin L. DePamphilis), *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Nov 1;4(11).

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・ **Nishiyama T**: Regulation of cohesin dynamics in entry into mitosis. The 18th IMCB Symposium, “SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) proteins from molecule to disease” Tokyo, 29th Nov. 2013
- ・ **西山朋子**: 姉妹をつなぐ: 姉妹染色分体間接着のしくみ. 平成 25 年度 遺伝研研究会、三島、2013 年 10 月
- ・ **西山朋子**: 姉妹染色分体間接着の確立と解離の時空間制御. 第 65 回日本細胞生物学会、名古屋、2013 年 6 月
- ・ **西山朋子**: 分裂期における姉妹染色分体間接着解離のメカニズム. 第 35 回日本分子生物学会、博多、2012 年 12 月
- ・ **Nishiyama T**: How sisters get together; Mechanisms of sister chromatid cohesion. Kumamoto University, Liaison Laboratory regular seminar, Kumamoto, 2012, May