

博士論文

ゲノムワイド解析によるコヒーシニアセチル化酵素の役割の解明

石橋 舞

## 目次

論文の内容の要旨	3
略語一覧	7
1. 序論	8
2. 材料と方法	17
3. 結果と考察	30
図、表	47
4. 総合討論	64
5. 参考文献	69
謝辞	79

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成27年度博士課程進学  
氏名 石橋 舞  
指導教員名 白髭 克彦

## 論文題目

ゲノムワイド解析によるコヒーシニアセチル化酵素の役割の解明

### 1. 序論

真核細胞が分裂する際には、DNA複製期（S期）に倍加された同一の遺伝情報をもつDNA分子（姉妹染色分体）の対を娘細胞へ均等に分配しなければならない。進化的に保存された染色体構造制御タンパク質であるコヒーシンは、間期核中で姉妹染色分体間に連結（姉妹染色分体間接着）を形成することで、娘細胞への遺伝情報の均等な分配を保証する。また、コヒーシンは姉妹染色分体間接着のみでなく、DNA損傷修復や転写制御においても役割を果たしていることが近年明らかとなってきた。コヒーシンは、Smc3サブユニットがアセチル化されることにより染色体に安定に結合できるようになることが知られている。ヒトではEsco1、Esco2と呼ばれる二種類のアセチル化酵素がSmc3アセチル化を行う。遺伝学的解析よりEsco1とEsco2は代替できない固有の機能を各々もつことが示されているが、機能分担の詳細は明らかではない。両因子が染色体上のどこで機能しているか明らかにすることは、Esco1、Esco2の細胞内機能の理解を進める上で極めて重要である。

ChIP-seq解析は核内タンパク質の染色体上での結合位置を網羅的に決定する実験手法である。所属研究室のこれまでの研究から、Esco1と異なり、Esco2の局在位置は標準的なChIP-seq解析では検出できないことが明らかとなっていた。これは、Esco2の結合位置が染色体上で十分限局されておらず、広範な領域に遍在的に結合しているためでないかと、様々な状況証拠に基づき筆者は考えた。ChIP-seq解析の感度と定量性を向上させることがEsco2の染色体結合を捉えるために必要と考えられた。

本研究では、ChIP-seq解析に実験・解析の両面における工夫を施し、捉えがたかったEsco2の染色体結合の様相を明らかにすることを目的とした。そして、得られた結果をEsco1のものと比較することにより、Esco1、Esco2が細胞内で果たしている役割

を解明することを目指した。筆者は本研究の中で、実験計画全体の立案と ChIP-seq データの情報学的解析、および結果の解釈とそれに基づく実験計画の再構成を行なった。ChIP-seq データの取得等の実験部分は、所属研究室の坂東優篤博士、吉村充騎博士によって行われた。また最終節で用いた Hi-C 解析の実験データ取得は坂田豊典博士によって行われた。

## 2. 定量的 ChIP-seq 法による Esco2 の染色体結合分布の解析

ChIP サンプル調整時に識別可能な外来 DNA を等量添加し、これを内部標準として用いることでサンプル間の定量的な比較を可能とする手法 (calibrated ChIP-seq) が近年報告された。本研究ではこの calibrated ChIP-seq を採用することで、まず実験面での改良を行った。これにより、Esco2 ChIP-seq データの細胞周期における変化や、Esco2 ノックダウン (KD) 条件下での結果との比較を厳密に行うことが可能となった。標準的な ChIP-seq 解析パイプラインではゲノムを 100 bp 程度の区画 (bin) に区切って解析を行う。このやり方では、非限局的に結合するタンパク質の結合が (ヒストンのような豊富に存在するタンパク質を例外として) ノイズから弁別できない問題があった。筆者は bin の大きさを最適化することにより、非限局的なタンパク質結合の検出を可能とする解析パイプラインを構築した。以上 2 点の工夫を施した ChIP-seq 解析を、ヒト Esco2 タンパク質に対して行った。Esco2 は S 期にのみ存在するタンパク質なので、細胞周期を early S, middle S および G2 期に同調させた HeLa 細胞を用いた。その結果、Esco2 の選択的な結合が見られる Mb スケールの領域が early S, middle S 期の細胞中に観察された。これらの領域は、複製がまだ完了していない染色体領域と良い一致を示した。先行研究では Esco2 は複製ヘリケース Mcm と物理的相互作用を示すことが報告されている。Mcm7 サブユニットに対して同様の ChIP-seq 解析を行ったところ、Mcm7 も Esco2 と酷似した結合パターンを示すことが見出された。以上の結果に基づき、Esco2 と Mcm ヘリケースは S 期細胞中の未複製の染色体領域に、非限局的に結合していると結論した。

## 3. 染色体上に非限局的に分布するコヒーシンの Esco2 によるアセチル化

次に Esco1、Esco2 が機能している染色体領域を直接可視化するために、アセチル化 Smc3 (Smc3ac) に特異的なモノクローナル抗体による ChIP-seq 解析を行った。染色体上にはコヒーシンが限局的に結合する箇所が約 3 万存在する。これらのコヒーシン結

合部位における Smc3ac 存在量は Esco1 KD により顕著に減少した一方で、Esco2 KD では大きく変化しなかった。Esco2 が標的とするコヒーシンは、限局的に結合するコヒーシンではないことが想起された。そこで、非限局性コヒーシンの存在を想定した Smc3ac ChIP-seq データの解析を行なった。その結果、非限局性の Smc3ac 結合は確かに存在し、それら非限局性コヒーシンのアセチル化は DNA 複製の進行と同じタイミングで起きていることが見出された。また、このアセチル化は Esco2 の存在に依存していた。Esco2 は DNA 複製と共役して非限局性のコヒーシンを S 期にアセチル化していることが強く示唆された。

この非限局性 Smc3ac の解析では、複製に伴う Esco2 のコヒーシンアセチル化は染色体全域で起こるものの、複製タイミングの早い染色体領域（主にユークロマチンに相当）では一度上昇した Smc3ac 結合量が G2 期に至るまでに元のレベルまで減少してしまうことが観察された。S 期にアセチル化されたコヒーシンの辿る運命は染色体領域ごとに異なることを示す意外な結果であった。

#### 4. Esco2 による姉妹染色分体間の接着確立の可視化

上述のように、複製タイミングの早い領域では Esco2 によるコヒーシンアセチル化は一過性であった。アセチル化されても接着確立に至らず、染色体上から失われてしまうコヒーシンが存在すると考えられた。

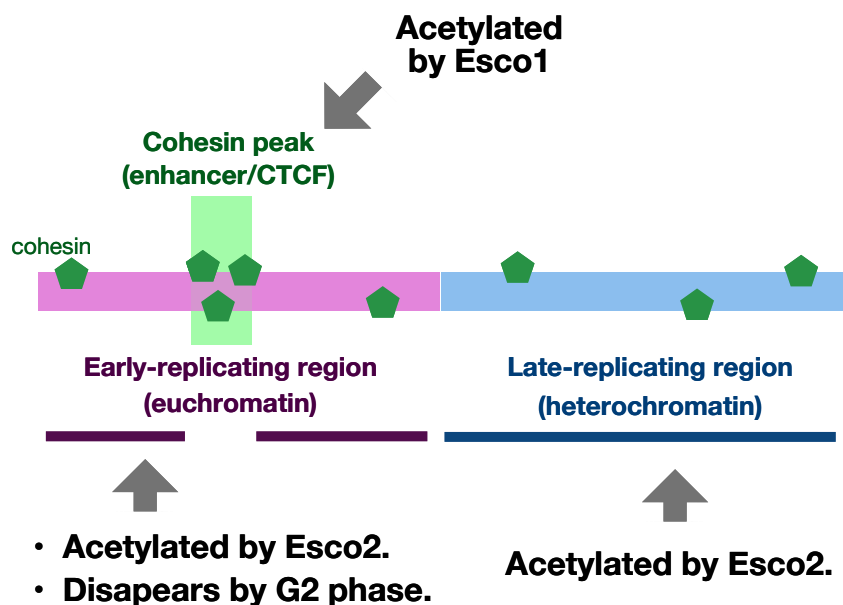
高等真核生物では接着確立に Sororin と呼ばれるタンパク質も必要であり、Sororin の染色体結合はコヒーシンアセチル化と DNA 複製に依存することが知られている。そこで、公共データベース上の ChIP-seq データを活用して非限局性 Sororin の結合量を計算したところ、Sororin は G2 期細胞中で複製タイミングの遅い染色体領域により多く結合することがわかった。複製タイミングの早い領域では Sororin のコヒーシン結合が十分に起きないため、Smc3ac が染色体から失われるものと推察された。

姉妹染色分体間の接着を担うコヒーシンは S 期に DNA 複製と共役してアセチル化されると考えられている。そこで、本研究で見出された Esco2 による非限局性のコヒーシンのアセチル化が接着確立に寄与しているかを検討した。Hi-C 法は染色体上の任意の 2 点が核内 3 次元空間で近接して存在する頻度を計量する実験手法である。Hi-C 解析の実験データを利用し、姉妹染色分体間接着に由来する DNA 相互作用を検出することを試みた。一次元配列上で極めて近い 2 点の接触頻度（近位相互作用）は、G1 期と比べ G2 期で上昇していることがわかった。この差分が姉妹染色分体間の接着に基づく

相互作用でないかと考えられた。次に、middle S 期と G2 期の Hi-C データを比較すると、複製タイミングの遅い染色体領域では近位相互作用が増加するが、複製タイミングの早い領域ではむしろ減少していることが観察された。この消長は Esco2 依存性のコヒーシニアセチル化が middle S 期から G2 期の間を示す増減と一致していた。複製タイミングの遅い染色体領域で選択的に維持される Esco2 依存性のアセチル化は姉妹染色分体間の接着に寄与しているという仮説を支持するものだと言える。

## 5. 総括

本研究では、従来の ChIP-seq 解析方法では見出されてこなかった広範な染色体領域に非限局的に分布する Esco2、コヒーシン、アセチル化コヒーシンの結合を同定することに成功した。Esco1 と Esco2 が機能する細胞周期での時期や染色体領域の相違が染色体全域において明らかになった。Esco1 は染色体に結合する限局性コヒーシンを主なアセチル化の標的とするのに対し、Esco2 は非限局性コヒーシンを複製と共役して染色体全域にわたってアセチル化することが明らかになった。また、Esco2 依存性のアセチル化コヒーシンは、複製タイミングの遅い染色体領域で選択的に維持されることを見出された。Hi-C 解析からは、この Esco2 依存性のアセチル化コヒーシンが姉妹染色分体間接着に寄与していることが示唆された。Esco2 に変異を持つヒト遺伝性疾患 Roberts 症候群では、セントロメア周辺部のヘテロクロマチン領域に特異的な染色分体間接着の欠損が見られることが知られていた。ヘテロクロマチンが複製タイミングの遅い領域であることを考えると、本研究の結果は Roberts 症候群の細胞表現型ともよく合致するものだと言える。



## 略語一覧

ChIP Chromatin Immunoprecipitation

ChIP-chip ChIP followed by microarray chip hybridization

ChIP-qPCR ChIP followed by quantitative PCR

ChIP-seq ChIP followed by high-throughput sequencing

MCM minichromosome maintenance

PCR polymerase chain reaction

siRNA small interfering RNA

SMC structural maintenance of chromosome

## 1. 序論

### 1.1 姉妹染色分体間の接着は娘細胞への正確な遺伝情報継承に不可欠である

細胞が分裂する際には、遺伝情報である DNA を複製し、2つの娘細胞へ正確に分配しなければならない。真核生物においては、分裂期（M期）に入ると DNA は高度に凝縮し分裂期染色体を形作る。それぞれの染色体は、DNA 複製期（S期）に倍加された同一の遺伝情報をもつ DNA 分子（姉妹染色分体）の対から構成されており、姉妹染色分体同士は物理的に繋ぎとめられている。これを姉妹染色分体間の接着と呼ぶ。姉妹染色分体間の接着によって、細胞は同一の遺伝情報をもつ分子を S 期から M 期にわたり束ねているのである。

姉妹染色分体間の接着は核分裂時に遺伝情報を二つの娘細胞に均等に分配するためにきわめて重要な役割を持つ。M 期中期において染色体は細胞の赤道面に整列し、細胞の両極から伸びた紡錘糸に捕らえられる。紡錘糸と染色体は、接着された姉妹染色分体同士に張力が生じる方向（二方向性）に引っ張られるまで結合と解離を繰り返す。全ての姉妹染色分体のセットに対して二方向性が確立すると、姉妹染色分体間の接着が壊れ、各々の姉妹染色分体のセットが二つの異なる極の方向に一斉に分離する。細胞は姉妹染色分体間の接着を手がかりとして、両極へと分けるべき同一の遺伝情報をもつ DNA 分子の対を認識している。実際、接着を欠く細胞では姉妹染色分体が対称に分離せず染色体異数性を引き起こす。したがって、姉妹染色分体間の接着は、細胞が正常な核分裂を司る上で不可欠な機構である。

### 1.2 コヒーシン複合体は姉妹染色分体をトポロジカルに束ね接着に寄与する

コヒーシンは姉妹染色分体間の接着を司るタンパク質として発見された (Michaelis *et al.*, 1997; Guacci *et al.*, 1997; Losada *et al.*, 1998)。酵母からヒトまで進化的によく保存され、二つの SMC タンパク質 (structural maintenance of chromosome) である



Smc1、Smc3 と、Rad21 (Scc1/Mcd1 と呼ばれる)、そして SA (Scc3 と呼ばれる) の 4 つのサブユニットから構成される (図 1a)。電子顕微鏡下では 4 つのサブユニットがリング様構造を形成することが観察されている (Uhlmann, 2016)。酵母の微小染色体を用いた一連の巧妙な実験から、コヒーシンはリング内に姉妹染色分体の対を閉じ込めることで姉妹染色分体間の接着を行うというモデルが提唱されている (Ivanov & Nasmyth *et al.*, 2005; Hearing *et al.*, 2008)。

### 1.3 コヒーシンの染色体結合の細胞周期制御

図 1b に各細胞周期におけるコヒーシンと染色体結合の概略を示した。M 期終期から G1 期になるとコヒーシンは Nipbl-Mau2 (Scc2-Scc4) 複合体によって染色体上にロードされる。通常、コヒーシンと DNA との結合は動的であり、コヒーシンは染色体への結合と解離を繰り返している。コヒーシンの解離は Wapl-Pds5 複合体の作用によって Rad21-Smc3 サブユニット間の相互作用が減弱し、コヒーシンリングが開裂することによると考えられている。S 期になると、染色体上に安定に結合するコヒーシンが現れる。姉妹染色分体間の接着を確立したコヒーシンである。FRAP 法 (fluorescence recovery after photobleaching) を用いた実験では、G2 期のコヒーシンの約 1/3 が、G1 期のコヒーシンよりも長く染色体上に滞留する様子が観察されている (Gerlich *et al.*, 2006)。具体的には、G1 期には 30 分以下であった滞留時間が G2 期では 6 時間以上へと変化したと報告されている。

M 期にコヒーシンが染色体から解離することで染色体分離がなされるが、この解離は 2 段階の過程で進むことが知られている。まず M 期前期に染色体腕部のコヒーシン解離が Wapl によって引き起こされる (Gandhi *et al.*, 2006; Kueng *et al.*, 2006)。“Prophase pathway”と呼ばれるこの過程で、高等真核生物では大部分のコヒーシンが染色体から解離する。一方で、Wapl の解離作用を免れたセントロメア領域のコヒーシ

ンは M 期後期の開始と共に染色体から解離する。これは *Separase* と呼ばれるプロテアーゼが *Rad21* を切断することによる (*Waizenegger et al., 2002*)。染色体の双方向性が確立するまでセントロメア領域の接着が維持されることで、遺伝情報の均等な分配が保証される (*Sakuno and Watanabe et al., 2009*)。

#### 1.4 姉妹染色分体間の接着の分子機構

コヒーシンが S 期に接着を確立する、すなわち姉妹染色分体対をリング内に収めた状態で染色体に安定的に結合するためには、*Smc3* サブユニットのアセチル化が不可欠である。*Smc3* アセチル化は *Wapl-Pds5* によるコヒーシン解離反応に拮抗することで、コヒーシンと DNA との結合を安定化する (*Ben-Sharhar et al., 2008; Sutani et al., 2009; Rowland et al., 2009*)。

出芽酵母のコヒーシンアセチル化酵素 *Eco1* は接着欠損を呈する酵母変異株の探索の中で見出された (*Skibbens et al., 1999; Toth et al., 1999*)。 *Eco1* は S 期の接着確立に必須であるものの、G2 期から M 期の接着維持には必要ないことが知られている。 *Eco1* は C 末にアセチル化酵素様のドメイン、N 末に C2H2 zinc finger ドメインを持ち、*Smc3* 分子内の保存された 2 つのリシン残基 *K112/K113* をアセチル化することが示された (*Unal et al., 2008; Ivanov et al., 2002*)。このリシンをアラニンに置換すると *Eco1* によるアセチル化がなされず、接着欠損とゲノム不安定性を引き起こすことが報告されている (*Zhang et al., 2008*)。 *Smc3* のアセチル化機構は進化的に高度に保存され、ヒトでは *Eco1* のオーソログが *Smc3* 分子内の対応するリシン残基 *K105/K106* を標的としてアセチル化を行う (*Zhang et al., 2008*)。高等真核生物においては、*Smc3* アセチル化は *Sororin* の結合を引き起こすことが知られている (*Rankin et al., 2005; Schmitz et al., 2007*)。すなわち、高等真核生物の接着確立には *Smc3* アセチル化に加え *Sororin* のコヒーシンへの結合が必要である。 *Sororin* は *Wapl* によるコヒーシン解離反応に拮

抗することで接着を確立すると考えられている (Lafont *et al.*, 2010; Nishiyama *et al.*, 2010)。

### 1.5 コヒーシンは複製に共役して姉妹染色分体間の接着を行う

姉妹染色分体間の接着が S 期に確立されることから、接着の確立は複製時に起こる何らかの反応と共役してなされると考えられてきた。実際に、出芽酵母において Rad21 の発現を S 期の完了まで抑制すると接着がなされないことが見出されている。出芽酵母を用いた初期の研究から、Ctf18-RFC 複合体、Ctf4、Mrc1-Tof1-Csm3 複合体、Chl1 といった複製フォークの関連タンパク質の変異株が弱い接着欠陥を示すことが次々と明らかにされた (Mayer *et al.*, 2001; Hanna *et al.*, 2001; Warren *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004; Skibbens *et al.*, 2004)。また、Eco1 の分子内に DNA ポリメラーゼの補因子 PCNA と結合する PIP ボックスが存在すること、この PIP ボックスを介した Eco1 と PCNA との結合が接着確立に必須であることが報告されている (Moldovan *et al.*, 2006; Lengronne *et al.*, 2006)。Eco1 は PCNA をはじめとする複製装置内の因子と協調し複製依存的なコヒーシンアセチル化を行うと考えられている。高等真核生物においても、これらの複製関連タンパク質のオーソログが接着に寄与することが明らかにされている (Farina *et al.*, 2008; Errico *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009)。

その後、アフリカツメガエルの Eco1 オーソログ XEco2 が複製前複合体 pre-RC に依存的にクロマチンに結合し Smc3 アセチル化を行うこと、アセチル化されたコヒーシンと DNA との相互作用が複製後に強まることが示された (Higashi *et al.*, 2012)。ヒトにおいても同様に、Esco2 のクロマチンへの結合が複製ヘリケース MCM 複合体との相互作用に依存すること、この相互作用は Smc3 のアセチル化と姉妹染色分体間の接着に必要なことが報告されている (Ivanov *et al.*, 2018; Minamino *et al.*, 2018)。また、複製の時期を遅らせると、呼応して Smc3 アセチル化の時期も遅れるという報告もある。

Eco1 ファミリータンパク質による Smc3 のアセチル化が複製反応と協調して起こることとは進化を通じて保存された反応といえる。しかし、その協調のメカニズムの詳細は種間で異なっている。

### 1.6 姉妹染色分体間の接着以外のコヒーシン機能

コヒーシンは姉妹染色分体間の接着に加え、DNA をリング内に束ねる活性を利用して様々な染色体機能を司ることが知られている。コヒーシンは、損傷を負った DNA 鎖を鋳型となる DNA 鎖と共に束ね、正確な DNA 損傷修復反応を支えている。また、近年では、高等真核生物において DNA をループ状に束ねることでエンハンサーとプロモーター間を空間的に近接させ相互作用させたり、逆に相互作用を遮断したりして遺伝子の発現を制御することが明らかになってきた。数十から数百 Mb 規模の染色体領域を区分けし、TAD と呼ばれる染色体の高次構造を形成するといった、染色体構造の構築においても重要な役割を担っていることがわかってきている。

### 1.7 ヒト Esco1 と Esco2 の冗長性と特異性

高等真核生物の Eco1 オーソログには2種類のパラログが存在し、ヒトやマウスでは Esco1、Esco2、アフリカツメガエルでは XEco1 と XEco2 と呼ばれている (図 1c)。これまでに、様々な研究から両因子が互いに代替できない固有の機能を持つことが示唆されているが、各々の役割分担の詳細は明らかではない。

ヒトの Esco1 と Esco2 は C 末の保存されたアセチル基転移ドメインを介して Smc3 のアセチル化を行う (Hou *et al.*, 2005)。一方で、配列保存性の低い N 末残基は DNA への結合を媒介しており、両因子が異なる機構を介して染色体上に結合する基盤となっている (Hou *et al.*, 2005; Higashi *et al.*, 2012; Minamino *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2018)。

Esco1 と Esco2 は Smc3 分子内の同一のリシン残基 K105/106 をアセチル化する。Esco1、Esco2 いずれかをノックダウンした培養細胞では Smc3 アセチル化と姉妹染色分体間の接着に欠陥がみられ、この表現型は両因子を同時にノックダウンするとさらに増幅する。このことは、両因子は共に姉妹染色分体間の接着に機能するがそれは独立した機構でなされることを示している (Hou *et al.*, 2005)。

Esco1 と Esco2 の違いは細胞周期における制御にもみられる。Esco1 は細胞周期全体を通じて発現するが、M 期にはリン酸化によりコヒーシンへの結合が阻害され機能が抑制される。一方で、Esco2 は S 期のみ発現し複製の後には速やかに分解される (Lafont *et al.*, 2010; Minamino *et al.*, 2018)。接着に寄与するアセチル化は S 期に起こるものに限られる。1.9 で詳述するように、G1、G2 期でもアセチル化を行う Esco1 には姉妹染色分体間の接着以外のコヒーシン機能、特に遺伝子発現制御への関与が示唆されている。

アフリカツメガエルやマウスの胎生期においては XEco1/Esco1 は発現せず XEco2/Esco2 のみが機能する。アフリカツメガエルの卵抽出液を用いた実験では XEco2 の欠損により Smc3 アセチル化と姉妹染色分体間の接着が完全に損なわれることが示されている (Higashi *et al.*, 2012)。Esco2 のノックアウトマウスは胚発生初期に致死に至り細胞には多くの染色体不分離が観察される (Whelan *et al.*, 2012)。これはマウスの Esco2 がこの時期の生存に必須であることを示す。

一方で、ヒト Esco2 はロバーツ症候群 (RBS) と呼ばれる常染色体劣性遺伝病の原因遺伝子である (Vega *et al.*, 2005)。RBS では Esco2 分子内のアセチル基転移ドメインが欠失していることが知られている。よって、RBS 患者が生存できることは、ヒトでは Esco2 が胚発生期の生存に必須ではなく Esco1 が Esco2 の機能の一部を代替できることを示唆している。この疾患の患者は頭部や顔面、四肢に特徴的な発達異常を呈するが、これらの異常が接着欠損に起因するものか、接着以外のコヒーシンの機能に依る

ものかはわかっていない。また、患者の M 期中期の染色体ではセントロメア周辺領域において姉妹染色分体が分離する“pericentric repulsion”や、その結果として姉妹染色分体対が並列する“railroad track appearance”が観察される (Van Den Berg *et al.*, 1993; Maserati *et al.*, 1991)。Esco2 欠損細胞では“railroad track appearance”を呈するものが多いこと、この異常が Esco2 の異所的発現によって回復することが示されており、セントロメア周辺領域は Esco2 が機能する主要な領域であることが示唆される。

### 1.8 クロマチン免疫沈降法 (ChIP) に基づく染色体結合タンパク質結合部位の解析

染色体上では様々なタンパク質が結合・解離・相互作用することで転写や複製、DNA 損傷修復といった多様な染色体機能を厳密に制御し、細胞の生存や機能に重要な役割を果たしている。ChIP は、注目するタンパク質の結合する染色体部分領域を抗体により濃縮する実験手法である。ChIP によって得られた領域 DNA は、DNA タイピングアレイや最近では次世代シーケンサーによって配列を決定することができる (それぞれ ChIP-chip 法、ChIP-seq 法と呼ばれる)。ChIP によって得られた領域 DNA の配列がリファレンスゲノム上のどの位置に適合するかを情報学的に探索することで、染色体上のタンパク質結合部位を高解像度で明らかにすることができる。これらのゲノム学的手法を用いた研究では、注目するタンパク質の結合する染色体領域の特徴や他のタンパク質との共局在などを解析することで、注目するタンパク質の機能を推測することが行われる。

これまでに、ゲノム学的手法によってコヒーシンの染色体上での結合分布が解析され、生物種によって特徴が異なることが明らかにされている。出芽酵母では、コヒーシンの 8 割以上は遺伝子間領域、特に隣接する遺伝子の転写が収斂する領域に分布する。この局在は、コヒーシンがローディングされた部位から転写の収斂する部位まで転写によっ

て押されるために生じると考えられている (Lengronne *et al.*, 2004)。一方で、マウスやヒトではコヒーシ sites は遺伝子内および周辺と遺伝子間とはほぼ同数みられ、遺伝子内では特に転写開始点と終結点に偏って分布することが知られている (Parelho *et al.*, 2008; Wendt *et al.*, 2008)。マウスやヒトの 7-9 割のコヒーシ結合部位にはインシュレータータンパク質 CTCF が結合しており、ここで形成されるクロマチンループ構造がプロモーター・エンハンサー間相互作用を遮断し不適切な遺伝子発現を抑制することが示されている (Parelho *et al.*, 2008; Wendt *et al.*, 2008)。CTCF を欠損すると、染色体上でのコヒーシ結合総量は変化しないまま CTCF 結合サイトでのコヒーシ存在量が減少する。このことは、CTCF がコヒーシのローディングではなく染色体上での配置に機能することを示唆している (Parelho *et al.*, 2008)。また、マウスやヒトのコヒーシは転写活性の高い遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域にも結合がみられ、ここではコヒーシが Nipbl やメディアーター複合体、組織特異的な転写因子と共局在することが報告されている (Kagey *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013)。

## 1.9 本研究の目的とアプローチ

1.7 で述べたように、Esco1 と Esco2 は互いに代替できない固有の機能を持つと考えられてきた。しかし、両因子の機能は一部重複しており各々の役割の違いは明確ではない。Esco1、Esco2 の染色体上での機能領域の違いを見出そうと、これまで顕微鏡を用いて M 期中期の姉妹染色分体で接着の様子が解析されてきたが、この手法では染色体全域にわたる詳細な解析は困難であった。

最近になって、ゲノムワイド解析により両因子の機能や染色体への結合機序の相違を理解する試みがなされた。Esco1 については、Pds5 依存的にコヒーシ結合サイトに局在することが示されている (Minamino *et al.*, 2015)。また、コヒーシ結合サイトにおいて Smc3 アセチル化を行うことや、Esco1 欠損によってコヒーシ結合サイト近

傍に位置する多くの遺伝子の発現が増加することが報告されている (Rahman *et al.*, 2015)。これらの知見から、Esco1 は姉妹染色分体間の接着に加え、遺伝子発現制御に関するコヒーシンの機能を制御している可能性が考えられる。

一方で、Esco2 は S 期に発現が限定されることから主に姉妹染色分体間の接着に関わっていると推測される。これと一致して、MCM ヘリケースとの共局在が S 期前期の細胞で観察され、Esco2 による Smc3 アセチル化が複製と共役してなされることが示唆されている (Ivanov *et al.*, 2018)。しかし、S 期の細胞を継時的に観察した場合に染色体上で Esco2 自体や Esco2 によりアセチル化されるコヒーシンが複製に伴って局在を変化させるのかは明らかにされていない。また、Esco2 による Smc3 アセチル化が複製と協調して起こるとして、その現象が Esco2 固有の機能と考えられるセントロメア周辺領域の姉妹染色分体間の接着にどう繋がるのかについては不明である。

ゲノム学的手法により染色体全域での Esco2 の結合領域や機能領域の継時的な変化を解析し、同一条件下で Esco1 と比較することで、両因子の住み分けをゲノムワイドかつ高解像度に明らかにできると期待される。そこで、本研究では、定量的 ChIP-seq 法 (ChIP サンプルの調整時に識別可能な外来 DNA を等量添加し、この DNA 量を内部標準として正規化を行う方法) により Esco1 とは異なる Esco2 の役割を見出すことを目的に研究を行なった。特に、Esco2 が S 期染色体上実際にどのように機能することで姉妹染色分体間の接着がなされるのかを解明することを目指した。

なお、筆者は本研究の中で、実験計画全体の立案と ChIP-seq データの情報学的解析、および結果の解釈とそれに基づく実験計画の再構成を行なった。ChIP-seq データの取得等の実験部分は、所属研究室の坂東優篤博士、吉村充騎博士によって行われた。また最終節で用いた Hi-C 解析の実験データ取得は坂田豊典博士によって行われた。



## 2. 材料と方法

### 2.1 細胞培養

HeLa S3 細胞をプラスチックディッシュ上に播種し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%の条件で培養した。培養液は高グルコース D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Wako) に 10% Fetal Bovine Serum (Biosera) とペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液 (Wako) を加えて使用した。過増殖しないうちに、細胞を PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> オートクレーブ滅菌) で洗浄した後、TrypLE™ Express (gibco) を添加することで細胞をディッシュから剥がした。細胞懸濁液をよく懸濁し、希釈して播き直すことで細胞の継代を行った。

### 2.2 細胞の同調

HeLa S3 細胞をダブルチミジンブロック法により early S 期に同調した。2 mM チミジン (Sigma) を添加した培養液中で 16 時間培養した後、PBS で 2 回、DMEM で 1 回洗浄することでリリースを行った。リリース後、9-10 時間細胞を培養し再度チミジンを添加した。チミジン添加後 14-15 時間培養することで細胞を S 期初期 (early S) に同調させた。S 中期 (middle S)、S 期終了後の G2 期の細胞を回収するために、2 度目のチミジンリリース後 3 時間、7 時間の細胞を回収した。また、複製指数の算出に使用した G2 期の細胞の同調には、細胞の M 期への侵入を防ぐために 2 度目のチミジンリリースから 7 時間後に Cdk1 阻害剤である RO-3306 (Tocris) を終濃度 10 mM で添加し、さらに 1.5 時間培養することで G2/M 期に同調した。

### 2.3 フローサイトメトリー解析 (FACS 解析)

回収した一部の細胞に終濃度 70%EtOH になるよう EtOH を添加した。そして、よく懸濁した後に-30°Cで保存し、細胞の固定を行った。固定した細胞を PBS で 2 回洗浄し、50 mg/mL RNase A (Roche) で RNA を除去した後、50 mg/mL, Propidium Iodide で DNA を染色した。染色された細胞の DNA 含有量は BD Accuri™ C6 Flow Cytometer (Becton Dickinson) で測定した。測定結果の解析は FlowJo (Becton Dickinson) を用いて行った。

### 2.4 RNA 干渉

siRNA のトランスフェクションは、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて添付のプロトコールに従って行った。siRNA は終濃度 50 nM で使用した。Mcm7 の siRNA は 1 度目のチミジン添加の 8 時間前、Esco1 の siRNA は一度目のチミジン添加と同時にトランスフェクションを行った。Esco2 の siRNA は 1 度目のチミジンリリースと同時にトランスフェクションおこなった。FACS 解析を用いて、ノックダウン条件下で細胞周期の進行に異常が無いことを確認している。

使用した stealth siRNA (Invitrogen) のセンス鎖の配列を以下に示す。

Esco1 siRNA: (5'-UGAAGUAUUUGUCUUUCAACACUGG-3')

Esco2 siRNA: (5'-AUAACUUGCCAUCUGGUGUUGGGUC-3')

Mcm7 siRNA: (5'- CGUCACUCGUGUCUCUGAAGUCAAA-3')

## 2.5 細胞分画

タンパク質抽出法は既報の論文 (Minamino *et al.*, 2018) を参考にして行った。培養した細胞をトリプシンで剥がした後、氷冷 DMEM で回収した。回収した細胞は遠心した後、氷冷 PBS を用いて 2 回洗浄を行った。再度氷冷 PBS に懸濁し、一部のサンプルを FACS 解析用に回収した。残りの細胞懸濁液をバッファーA (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerol, 0.2%NP40, 1 mM DTT, 10 mM sodium butyrate, protease inhibitor cocktail (Complete; Roche), PhosSTOP (Roche)) で懸濁、氷上で 10 分間静置し、Total fraction (total) とした。このサンプルに SDS sample バッファー (終濃度 52.5 mM Tris-HCl (pH6.8) , 100 mM DTT, 2.15 % SDS, 0.0025% Bromophenol blue, 7% glycerol) を加えて 95°C で 5 分間処理し、ソニケーター (Handy Sonic; TOMY) で DNA を剪断することで、泳動サンプルとした。

## 2.6 ウェスタンブロット法および定量的ウェスタン法

タンパク質の検出を行うためにウェスタンブロット法を用いた。作製したサンプルは SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にてタンパク質を展開し、Mini trans-blot cell (Bio-RAD) を用いて、ニトロセルロースメンブレン (Amersham Hybond-ECL; GE Healthcare) に転写した。これを、ブロッキングバッファー (PBS/0.1% Tween-20 (PBS-T) / 3% non-fat milk) に浸して、室温で30分間振盪した。このメンブレンをPBST/ 1 %non-fat milkで適宜希釈した一次抗体と室温で1時間または4°Cで一晩振盪した。一次抗体との反応後、PBS-Tで3回洗浄し、メンブレンを PBS-T/3% non-fat milkで希釈したHRP標識二次抗体に浸し室温で1時間反応させた。反応後、PBS-Tで3回洗浄し、Luminata Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore) で化学発光検出した。

Smc3acについては、タンパク質定量を正確に行うため定量的ウエスタンを行った。Jess (proteinsimple) を用いて添付のプロトコールに従った。Smc3acとSmc3は、それぞれ化学発光と蛍光で検出し、Compass for Simple Western (proteinsimple) を用いて、検出されたタンパク量の定量を行った。Smc3acのタンパク質量を算出するために、Smc3acの定量値をSmc3の定量値で正規化した。

## 2.7 抗体と試薬

ChIP 及びウエスタンブロッティング、定量的ウエスタンで使用した抗体を以下に示す。Smc3ac モノクローナル抗体 (マウス, Minamino *et al.*, 2015)、Rad21 ポリクローナル抗体 (ウサギ, Minamino *et al.*, 2015)、Esco1 ポリクローナル抗体 (マウス, Minamino *et al.*, 2015)、Esco2 ポリクローナル抗体 (ウサギ, Abcam, ab86003)、Smc3 ポリクローナル抗体 (ウサギ, Cell Signaling, 5696)、Smc1 ポリクローナル抗体 (ウサギ, Abcam, ab21583)、Mcm7 ポリクローナル抗体 (ウサギ, Cell Signaling, 3735)、 $\alpha$ -Tubulin モノクローナル抗体 (マウス, Sigma-Aldrich, T6074) を用いた。

## 2.8 クロマチン免疫沈降 (ChIP)

ChIPは既報の論文 (Deardorff *et al.*, 2012) に従って行った。 $\sim 1 \times 10^7$ の細胞を培養液に終濃度1%になるように37%ホルムアルデヒド溶液を加えて室温で10分間インキュベートし、固定した。次に2.5 M glycine/PBSを終濃度125 mMで加えさらに5分間インキュベートし、クロスリンク反応を停止させた。固定した細胞を氷冷PBSで2回洗浄した後、液体窒素で凍結し、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。細胞からクロマチン画分を回収するため、固定後の細胞を1.2 mLのLB1バッファー (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 0.25% Triton-X 100, 1 mM PMSF, 10 mM DTT) に懸濁して溶解し、氷上で10分間静置したのち、 $4^\circ\text{C}$ において

1,500×gで5分間遠心してクロマチン画分を回収した。クロマチン画分を1.2 mLのLB2バッファー (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) で懸濁し、10分間氷上でインキュベートした。4°Cにおいて1,500×gで5分間遠心した。1.2 mLのLB3バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TritonX-100, 0.1% Na-Deoxycolate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail (Complete; Roche))に懸濁し、10分間氷上でインキュベートし、4°Cにおいて1,500×gで5分間遠心した。さらに、400 µLのLB3バッファーを加えて、4°Cにおいて1,500×gで1分間遠心した。Branson Sonifier 250Dを使用してソニケーション (振幅を最大の17%で12秒間を6回、1回ごとに4°Cにおいて2,300×gで1分間遠心してスピンドアウン) を行い、クロマチンを断片化および可溶化した。次に4°Cにおいて20,000×gで15分間遠心し、回収した上清を断片化クロマチン溶液とした。

さらに、定量的ChIPを行うため、上記のヒト由来のクロマチン溶液にマウス由来のクロマチン溶液を混合させた。今回は、マウス筋芽細胞はC2C12細胞を使用した。マウスのクロマチン溶液の作成方法は、上記に記載したヒトのクロマチン溶液と同様の手法で行った。この、マウス由来のクロマチン液を、ヒトのクロマチン溶液に対して1/3から1/5量を添加した。このヒトとマウスの混合クロマチン溶液に抗体ビーズを加えて一晩4°Cで転倒混和した。またこの時、25 µLのヒトとマウスの混合クロマチン溶液に75 µLの溶出バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) を加えてinput DNAとした。抗体ビーズは以下のように調整した。50 µL の磁気ビーズ (Dynabeads Protein AまたはDynabeads Protein G (Life Technologies)) を5 mg/mL bovine serum albumin / PBS (BSA/PBS) で2回洗浄しBSA/PBSに懸濁した。懸濁液に2-5 µgの抗体を加え、4°Cで3時間以上転倒混和した。この抗体ビーズをBSA/PBSで2回、LB3バッファーで1回洗浄してChIPに使用した。クロマチン溶液と反応後、抗体ビーズをRIPA洗浄バッファー (50 mM HEPES-KOH pH 7.4, 0.5 M

LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholate) で5回、TE50バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) で1回洗浄した後、100  $\mu$ Lの溶出バッファーに懸濁した。その後、65°Cで20分間インキュベートし、抗体ビーズを常温において10,000 $\times$ gで1分間遠心しスピンドウンした。上清 (ChIPサンプル) とinput DNAを65°Cで6時間インキュベートし、脱クロスリンク反応を行った。その後、2  $\mu$ Lの50 mg/mL RNase (Roche) と100  $\mu$ LのTE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) を加え、50°Cで1時間インキュベートし、さらに、2  $\mu$ Lの50 mg/mL Proteinase K (Merck Millipore) を加え、50°Cで一晩インキュベートした。さらに、QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いてキット添付のプロトコールに従ってDNAを精製し、input DNA、ChIP DNAとした。

## 2.9 定量的 PCR (qPCR)

ChIP DNA の qPCR 解析は CFX384™ Real-Time System (BIO-RAD)と KAPA Fast qPCR kit (KAPA Biosystems) を用いて添付のプロトコールに従って行った。同じサンプルで2から3回繰り返し計測を行い、標準偏差を算出した。使用したプライマーペアは表 1 に示した。

## 2.10 シークエンシング

ChIP DNAおよびinput DNAは添付のプロトコールに従ってCovaris S2 Focused-ultrasonicator (Covaris) で約150-200 bpの長さに断片化した (Duty Cycle, 10%; Intensity, 5; Cycles per Vurst, 100; Duration, 300 sec)。シークエンシングライブラリはUltra II DNA Library Prep (NEB E7645)の標準プロトコールに従い調整した。ChIP DNAおよびinput DNAの配列は、HiSeq 2500 system (Illumina) によりsingle-end、65bpのシークエンシングを行い決定した。

## 2.11 マッピング・フィルタリング・クオリティチェック

下記の各処理段階でのリード数統計は表 2 に示した。シーケンシングにより決定された塩基配列（リード）は、まずマウスリファレンスゲノム UCSC mm10 から一致する配列を探索し（マッピング）、マウスゲノムにマップされるリードとマップされないリードに分類した。次に、各々をヒトリファレンスゲノム UCSC hg19 に対してマップした。マッピング後のリードのうち、マウスゲノムにマップされずヒトゲノムにのみマップされたリードを以降の解析に供した。ヒトゲノムにマップされずマウスゲノムにのみマップされたリード数は総リード数正規化（2.11）に利用した。マッピングは bowtie v2.3.4.1 (Langmead *et al.*, 2012) のデフォルトモード（配列のミスマッチを許容せず、最適なアラインメントを一箇所だけ出力する）により行った。

マッピング過程において、リファレンスゲノム上の一箇所にマップされるリード（unique read）と複数箇所にマップされるリード（redundant read）が存在する。Redundant read はゲノムの反復配列由来と考え、以降の解析は unique read のみを用いて解析を行った（フィルタリング）。また、リファレンスゲノム上の同一箇所にマップされる多数のリードは、PCR 増幅の際に特に増えやすい DNA 断片に由来していると考えられる。これらを実験上の artifact として予め取り除いた（PCR bias フィルタリング）。

ホ乳類細胞由来の point-source DNA binding factors（1-2 kbp 内の染色体領域に結合するタンパク質）の ChIP-seq 解析には 1 千万リード以上のデータを用いることが推奨されている (Landt *et al.*, 2012)。本実験では、ヒトゲノムにのみマップされるリード数が 3 千万リード以上あり、このうち redundant read が 1 割以下、PCR bias 由来のリードが 5%以下であった。したがってフィルタリング後のリード数は 2.5 千万リード以上あり、解析に供するに十分であると判断した（クオリティチェック）。

## 2.12 総リード数の正規化

各 ChIP-seq サンプルのリード数正規化は既報の論文 (Hu *et al.*, 2015) に倣って行った。この手法では大まかに次の流れで正規化を行う。(i) 対応する ChIP、input サンプルを用いて正規化定数 (Occupancy Ratio, OR) を算出する。(ii) ChIP サンプル、input サンプル共に総リード数を画一的に正規化する。(iii) ChIP サンプルにのみ (i) で算出した OR を乗しリード数を補正する。

(i) OR の算出は、マウス spike-in DNA 由来のリードは ChIP-seq サンプル間で等量であること、同一の ChIP-seq サンプルではヒト DNA への免疫沈降効率がマウス spike-in DNA への免疫沈降効率に比例することに基づく。具体的な OR の算出は以下の式による。

$$OR = (IP_{\text{experimental}} \times W_{\text{control}}) / (IP_{\text{control}} \times W_{\text{experimental}})$$

ただし、 $IP_{\text{experimental}}$  ; 実験対象 (本実験ではヒト) のリファレンスゲノムにのみマップされる ChIP リード数

$IP_{\text{control}}$  ; spike-in (本実験ではマウス) のリファレンスゲノムにのみマップされる ChIP リード数

$W_{\text{experimental}}$  ; 実験対象のリファレンスゲノムにのみマップされる input リード数

$W_{\text{control}}$  ; spike-in のリファレンスゲノムにのみマップされる input リード数

(ii)、(iii) の ChIP リード数の正規化にあたっては、input リードの総数を 2 千万とし、ChIP リードについては算出した正規化定数を input リード数 (2 千万) に乗することで正規化後の総リード数を決定した。その後、drompa v2.5.3 (Nakato *et al.*, 2013) の parse2wig において”-n GR -np <正規化後の総リード数>” をオプション指



定することで ChIP、input リード数の補正を行った。ヒトおよびマウスゲノムにマップされたリード数、算出された OR、正規化後のリード数は表 2 に示した。

### 2.13 ChIP-seq プロファイルの描画

リファレンスゲノム全域を一定幅の区画 bin に分割し、各々の bin 内にマップされる input、ChIP リード数を drompa v2.5.3 の parse2wig を用いて算出した。リファレンスゲノム上の位置に対する ChIP リード数の分布は drompa v2.5.3 の drompa\_draw PC\_SHARP モードを、ChIP/input 比の分布は PC\_ENRICH モードを用いて描画した。図 3a、図 6a において染色体上に限局的に結合するタンパク質に注目する際には bin を 100 bp とし ChIP リード数の分布を示した。図 4a、図 8a において非限局的に結合するタンパク質に注目する際には bin を 10 kbp とし ChIP/input 比の分布を示した。

### 2.14 ピークコール

染色体上に限局的に結合するタンパク質の結合部位は、drompa v2.5.3 の drompa\_peakcall PC\_SHARP モードにより同定した。この過程では、ゲノム全域の 100 bp の bin に対して、ChIP リードが有意に濃縮する bin が網羅的に抽出される。bin の抽出は下記の 2 段階の統計的検定により行われる。(i) 周辺に対して ChIP リードが有意に濃縮する bin を抽出する。タンパク質結合部位以外のゲノム領域 (バックグラウンド) の ChIP リード数はポワソン分布に従うと仮定し、各 bin がバックグラウンドである場合にその bin 内の ChIP リード数が偶然に得られる確率を負の二項検定により計算する。確率が閾値 (デフォルトでは  $10^{-4}$ ) 以下の bin を候補 bin として抽出する。(ii) (i) の候補 bin に対し、ChIP リードが input リードに対して有意に濃縮する bin を抽出する。バックグラウンドにおいては IP と input のリード数は同一

の平均・分散をもつ正規分布に従うと仮定し、各 bin において input リード数に対して ChIP リード数が偶然に得られる確率を二項検定により算出する。確率が閾値（デフォルトでは  $10^{-4}$ ）以下の bin を最終的なピーク領域として抽出する。

### 2.15 複製進行度の算出

G2/M 期の input リードの分布は、染色体全域で複製が完了している細胞集団での DNA 分布と捉えられる。したがって、あるゲノム領域での G2/M 期の input リード数に対する任意の ChIP-seq サンプルの input リード数の比率は、実際に ChIP-seq に供した細胞集団でそのゲノム領域がどの程度複製されていたかの指標（複製進行度）となる。この考えに基づき、各ゲノム領域の複製進行度は下記の手順で算出された。drompa v2.5.3 の parse2wig を用いて 100 kbp bin 毎の input リード数を各 ChIP-seq サンプルについて算出した。各 100 kbp bin について、注目する ChIP-seq サンプルの input リード数を G2/M 期の input リード数に対する比率で表した。ここで、early S 期の細胞では大部分のゲノム領域が複製されておらず、G2 期の細胞では大部分のゲノム領域が複製されていると考えられる。early S 期に対する G2/M 期の input リード比率の最頻値が 0%、G2 期に対する G2/M 期の input リード比率の最頻値が 100% となるように正規化し、複製進行度として用いた。

### 2.16 ヒートマップの描画

図 6b のヒートマップの描画は、deepTools (Ramirez *et al.*, 2016) により行った。computeMatrix reference-point モードにより、Esco ノックダウン処理をしていない細胞の 3 つの同調条件で共通して抽出される Rad21 ピーク (n=28,074) に対して、ピーク頂点を中心に上流・下流 2.5 kb 範囲の ChIP-seq シグナル強度を算出した。各ピークはピーク頂点の Rad21 ChIP-seq シグナル強度の降順にソートした。bin サイズ

ズは 100 bp にて計算した。出力された行列ファイルを `plotHeatmap` により描画した。

### 2.17 ピーク領域内の cFE 算出

自作スクリプト `annotate_peak.rb` を用いた。このスクリプトは、タンパク質結合量を算出したい領域の `bed` ファイルおよび `drompa` の `parse2wig` で算出された bin 毎の ChIP、input のリード数ファイルを入力とする。入力された `bed` ファイル内の各領域と 1 bp 以上被る bin を抽出し、該当 bin 内の input、ChIP リード数の合計を算出して返す。

図 7b、図 7d においてピーク領域のタンパク質結合量を算出する際には、100 bp bin にて算出したリード数と Esco ノックダウン処理をしていない細胞の 3 つの同調条件で共通して抽出される Rad21 ピーク (n=28,074) を使用した。図 7a において qPCR プライマー領域のタンパク質結合量を算出する際、ChIP リード数は qPCR プライマー領域内のリード数を 10 bp bin にて算出した。一方、input リード数は qPCR プライマー領域内では少なく誤差が多くなるため、qPCR プライマー領域周辺 3 kbp において 100 bp bin にて算出後、そのリード数を各 qPCR プライマー領域の長さに応じて正規化した。

### 2.18 非限局的に染色体に結合するタンパク質の cFE、FE 算出

自作スクリプト `annotate_100kb.rb` を用いた。このスクリプトは、除外したい領域の `bed` ファイルおよび `drompa` の `parse2wig` で算出された 100 bp bin 毎の ChIP、input のリード数ファイルを入力とする。始めに、入力された `bed` ファイル内の各領域と 1 bp 以上被る bin を抽出し、該当 bin 内の input、ChIP リード数を 0 に変換する。その後、100 bp bin の input、ChIP リード数を 1,000 bin ずつ積算することで、100 kbp bin 内にマップされる input、ChIP リードの合計を算出して返す。

図 8b、図 9a (上)、図 9b、図 9c、図 10 において非限局的に分布する Smc3ac、Rad21 タンパク質の結合量を算出する際には、除外したい領域としてコントロール細胞の 3 つの同調条件で共通して抽出される Rad21 ピーク (n=28,074) の bed ファイルを指定した。図 11a、図 11b において非限局的に分布する Sororin タンパク質の結合量を算出する際には、除外したい領域として各同調条件で抽出される Sororin ピーク (early S, n=9,585; mid S, n=26,877; G2, n=8,567) の bed ファイルを指定した。

## 2.19 散布図、箱髭図、ベン図、ドットプロットの描画と回帰直線、ピアソン相関係数の算出

R v3.6.1 を用いて行った。

## 2.20 Hi-C サンプルの調製およびシーケンシング

in situ Hi-C法は既報の論文 (Rao *et al.*, 2014) に従って行った。~ $3 \times 10^6$ の細胞を培養液に終濃度1%になるように37%ホルムアルデヒド溶液を加えて室温で10分間インキュベートし、クロマチンをクロスリンクし空間的に近接するDNAを固定した。次にglycine/PBSを終濃度200 mMで加えさらに5分間インキュベートした。固定した細胞を氷上でHi-C lysisバッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 0.2% Igepal CA630, 1 × protease inhibitor cocktail (Sigma)) により透過処理した。その後、100ユニットのMbo I (NEB) によってクロマチンを制限酵素消化し、断片の末端を平滑化すると同時にビオチンで標識したのちにライゲーション反応を行った。DNAを脱クロスリンクして精製したのち、ライゲーションしたDNAをCovaris S2 focused-ultrasonicatorで300-500 bpの長さに剪断した (Duty Cycle, 10%; Intensity, 4; Cycle per Burst, 200; Duration, 55 sec)。ライゲーションしたDNAはDynabeads MyOne Streptavidin T1 beads (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃縮し、

Nextera Mate Pair Sample Preparation Kit (Illumina)を用いて、末端を修復したのちにシーケンスアダプターを付加した。さらに、ビーズ上でDNAを増幅し、Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて添付のプロトコールに従って精製した。Hi-C DNAの配列は、HiSeq 2000 system (Illumina) によりpaired-end、150 bpのシーケンシングを行い決定した。

## 2.21 Hi-C データの情報学的解析

(i) マッピング、(ii) フィルタリング、(iii) コンタクト行列の算出、(iv) リード数正規化、(v) 可視化、までの一連の情報学的解析は Juicer v1.5.6 (Neva *et al.*, 2016) により行った。

(i) シーケンシングにより決定された 20 億対のリードペア (Read1、Read2) を、それぞれヒトリファレンスゲノム hg38 にマップした。(ii) Read1、Read2 の片方しかマップされないリードペアと、Read1 または Read2 がゲノム上の複数箇所にマップされるリードペアは予め取り除いた。また、同一の制限酵素断片上にあるリードペア、Hi-C で得られた DNA 断片のサイズが不適切であるリードペア、ゲノム上の同一箇所にマップされるリードペアも実験上の artifact として取り除いた。(iii) ゲノム全域を 50 kbp bin に分割し、各々の bin 内にマップされる Read1、Read2 の数を行列データとして格納した。(iv) matrix balancing 法により行列の各行、各列のリード数総和が同一になるように正規化し、クロマチン構造などに起因する領域間のリード数の偏りを補正した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 定量的 ChIP-seq 法による Esco2 の染色体上結合分布の解析

Esco1 と Esco2 の機能の差異を探るため、まず、両因子のヒト染色体上での結合分布を比較することを考えた。

所属研究室が過去に行った Esco1 についての研究の中で、筆者は Esco1 を標的とした ChIP-seq 実験の情報学的解析を担当した (Minamino *et al.*, 2015)。ここでは、Esco1 の結合部位は染色体全域に約 1 万個存在しており、その約 7 割が Rad21 や Pds5 と共局在していた。Pds5 をノックダウンした細胞ではこれらの Esco1 結合が染色体全域で消失することから、Esco1 が Pds5 依存的にコヒーシオン結合部位に局在することが明らかになった。また、G1 期と G2 期の Esco1 結合部位の約 8 割が共通であることから、Esco1 は間期の間大きくは局在を変えないことが示唆された。

本研究では Esco2 の染色体上での結合分布を解析することから着手した。ヒト染色体上への Esco2 の結合には複製ヘリケース MCM との物理的相互作用が必要であることが報告されている (Ivanov *et al.*, 2018; Minamino *et al.*, 2018)。Esco2 は MCM ヘリケースと局在を共にする、すなわち複製の進行に伴って局在を変化させる可能性が考えられた。そこで、S 期の 2 点 (early S, middle S 期) と G2 期に同調した HeLa 細胞を用い、Esco2 および MCM7 の局在変化を ChIP-seq 法によって解析することにした。細胞周期の同調はフローサイトメトリーで確認された (図 2 左)。Esco2、MCM7 は共に S 期に発現し G2 期に分解されるタンパク質であるが、その消長もウエスタンブロッティング法で確認された (図 2 右上)。

通常の ChIP-seq 解析過程では、シーケンシングにより決定された塩基配列 (リード) の数を画一的に正規化する (Landt *et al.*, 2012)。この背後には、異なるサンプル間で ChIP される DNA 量が等量であるという想定があるが、細胞周期の進行やノックダウンによって染色体へのタンパク質結合総量が増減する場合には、当然ながら ChIP

される DNA 量もサンプルごとに変化する。したがって、サンプル間で ChIP リード総数を画一的に正規化すると、各々の染色体領域でタンパク質結合量が増減したとしても、それを正確に評価することができない (Chen *et al.*, 2015)。そこで、本実験ではサンプル調製段階でマウス胸腺細胞由来の DNA を各サンプルに等量添加し、そのシーケンス産物であるマウス spike-in DNA 由来のリード数を内部標準として正規化を行う calibrated ChIP-seq 法を採用した (Hu *et al.*, 2015)。これにより、実験条件の異なるサンプル間で染色体上のタンパク質結合量を定量的に比較することが可能になった。

early S, middle S, G2 期に同調した細胞に対して Esco2、MCM7 を標的とした ChIP-seq を行い、各々の因子が結合する染色体部分の DNA 断片 (ChIP DNA) と ChIP 前の全染色体 DNA 断片 (input DNA) の多量な塩基配列を次世代シーケンサーを用いて決定した。ChIP、input リードをゲノム配列上にマップした後、ChIP-seq サンプル間でマウス spike-in DNA 由来のリード数が同一となるように ChIP リード数の正規化を行った。

### 3.2 Esco2 は広範な染色体領域に非限局的に分布する

一般に、リファレンスゲノム上における ChIP-seq リードの分布 (ChIP-seq プロファイル) は、注目するタンパク質が染色体上の各位置に結合している頻度を反映する。したがって、そのタンパク質が大多数の細胞においてある決まった染色体部位に結合している場合にはゲノム配列上の狭い領域に ChIP リードが大量にマップされるため、ChIP-seq プロファイル上に明瞭なピークを見出すことができる。一般的な ChIP-seq 解析では、このピークを統計的検定により抽出する (ピークコール) ことでタンパク質の染色体結合部位を同定する。ゲノム配列全域を 100 bp 程度の狭い区画 bin に分割し、各々の bin 内にマップされる ChIP リードが統計的に有意に濃縮する bin を網羅的に抽出するのである。なお、ピークコール法で同定されるタンパク質結合部位は数 kbp 程

度までの狭い領域に限られる (Bailey *et al.*, 2013) ため、こうした狭い染色体領域へのタンパク質結合を本論文では「限局的な結合」と呼ぶことにする。

マウス spike-in DNA により正規化された ChIP-seq リードを用い、まず、bin サイズ 100 bp にてピークコールを行い Esco2 の結合部位同定を試みた。その結果、染色体全域で抽出された Esco2 のピーク数は最も多い middle S 期においても 6 百個程度であり、約 3 万個存在するコヒーシン結合部位と比較すると非常に少なかった (図 3a, 図 3b 上)。また、同一条件 (middle S 期) の細胞を用いた 2 回の独立した実験では抽出されるピークのほとんどが一致しなかった (図 3b 下)。このことは、抽出できた Esco2 ピークはほとんどが偽陽性のシグナルであることを示唆している。狭い bin に対して統計的検定を行う一般的な方法では Esco2 の結合部位を同定できないと考えられた。先行研究においても Esco2 はピークとして捕らえられるような限局的な局在は示さないという報告がなされている (Rahman S *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2017)。MCM7 についても同様で、ピークを抽出することはできなかった。

Esco2 のピークが抽出できない理由として、Esco2 の結合部位が細胞ごとにばらばらである、すなわち局在が十分限局的でないことが考えられた。仮に Esco2 が結合する染色体上の位置が細胞ごとにばらついているとすれば、ChIP リードはゲノム配列上の広い領域に分散してマップされるため、100 bp 程度の狭い bin にマップされるリード数は極めて少なくなる。このため、統計的有意差をもって ChIP リードの濃縮を抽出することが困難となる。そこで、bin サイズを 10 kbp へと拡大し統計的検出力を高めた上で ChIP リードが濃縮する領域を抽出することを検討した。この際、リード数をマウス spike-in DNA により正規化したリードを用いて ChIP 前後での比 (ChIP/input) を cFE (calibrated fold enrichment ratio) として計算することで、より正確に結合頻度を捉えられるようにした。

得られた結果を図 4a に示す (第 10 番染色体の一部)。Esco2、MCM7 の双方とも S



期染色体上で数百 kbp～数 Mbp に渡って cFE の上昇している領域が見出された。両因子の ChIP 濃縮領域は多くの箇所共通しており (図 4a)、その cFE の値は染色体全域に渡って良い相関を示した (図 4b)。Esco2 と MCM7 は広い染色体領域に非限局的に結合しており、また、結合領域は二つのタンパク質で共通していることがわかった。

見出された Esco2、MCM7 の ChIP 濃縮が両因子の真の染色体結合に基づくことは、以下の諸点から確認された。(i) Esco2、MCM7 のいずれも、独立した実験間の ChIP-seq プロファイルが高い相関を示し、再現性があることが確認された (図 4c)。(ii) Esco2、MCM7 の ChIP 濃縮は G2 期細胞では検出されなかった (図 4a, 図 4b)。これは G2 期細胞では分解により Esco2、MCM7 のタンパク質量が減少していることとよく一致する (図 2 右上)。(iii) S 期において Esco2、MCM7 をノックダウンした細胞でも ChIP 濃縮は見出されなかった (図 4a)

Esco2、MCM7 が広範な染色体領域に非限局的に結合することは、MUSIC という既存のツール (Harmanci *et al.*, 2014) を用いた解析でも確かめられた。このツールは結合領域の幅の大きさの分布について情報を与えてくれる。コヒーシンや Esco1 のように明瞭な ChIP-seq ピークを示すタンパク質と異なり、Esco2、MCM7 は bin サイズ 10 kbp 以上で結合領域が多く見出されることから、Esco2、MCM7 の結合領域は十 kb スケール以上のものが主体であることが確かめられた (図 4d)。

### 3.3 Esco2 と MCM7 は複製が未完了の染色体領域に結合している

真核生物の長い染色体 DNA は、S 期の間に染色体領域ごとに決められたタイミングで複製される。この機構は、染色体 DNA 上に活性の異なる複製起点が多数存在し、それぞれが固有のタイミングで複製を開始することで制御されている。ある染色体領域が S 期のいつ頃に複製されるかは実験的に決定されている。

early S 期、middle S 期の ChIP-seq プロファイルを詳細に観察すると、Esco2、MCM7

の非限局性結合領域は複製タイミングの遅い領域と呼応することが見出された(図 4a)。また、Esco2、MCM7 結合領域は構成的ヘテロクロマチンを示すヒストン修飾、H3K9me3 の結合領域とも良い一致を示した。これは、ヘテロクロマチンの複製タイミングは遅いという知見と相容れるものである。

複製タイミングの早い染色体領域では、Esco2 の cFE 値は 1 程度であった。この値は、Esco2 ノックダウンにより Esco2 タンパク質量が検知できないレベルまで減少した細胞での染色体全域の cFE 平均値と同程度であった(図 4a、図 5a)。このことは、Esco2 ChIP-seq のバックグラウンドノイズは cFE=1 程度の大きさがあり、複製タイミングの早い染色体領域への Esco2 結合は検出限界以下のレベルであることを意味すると考えられた。なお、Esco2 とは異なり MCM7 ではノックダウン処理を施しても MCM7 タンパク質が相当量残存していたため、ChIP-seq のバックグラウンドレベルを推定することができなかった(図 4a、図 5a)。

複製と Esco2、MCM7 染色体結合との関係をより詳細に解析するため、実際に ChIP-seq に供した細胞集団中で各染色体領域がどの程度複製されていたか(以下、その程度を複製進行度と呼ぶ)をリードから算出することにした。これは、各細胞周期の input リード数をその細胞での DNA コピー数と見なし、G2 後期(G2/M)のそれを基準として正規化することで行われた。複製タイミングが早いとされる領域は複製進行度が early S 期から上昇すること、逆に、複製タイミングが遅い領域は middle S 期以降に複製進行度が上昇することが確かめられた(図 5b)。複製進行度と Esco2、MCM7 の cFE 値との関係を染色体全域で調べたところ、その染色体領域の複製が進行するに従って cFE 値が減少する、すなわち Esco2、MCM7 の結合が失われることが見出された(図 5a)。MCM ヘリケースは G1 後期には染色体に結合しており、複製を完了すると染色体から脱落することが知られている(Prasanth, S G *et al.*, 2004)。MCM7 の ChIP-seq 解析結果はこの知見とよく一致するものである。また、本実験より、Esco2

は MCM7 と同様に各々の細胞周期の時点で複製の完了していない染色体領域に選択的に結合していると結論づけた。

### 3.4 定量的 ChIP-seq によるアセチル化コヒーシンの染色体上結合分布の解析

3.1 から 3.3 で行った解析により、コヒーシン結合部位に限局的に局在する Esco1 とは異なり、Esco2 はコヒーシン結合部位には局在せず、未複製の染色体領域に非限局的に結合することが明らかになった。Esco1 と Esco2 に結合分布の違いがあることは、両因子がヒト染色体上の別々の領域で機能することを示唆する。しかし、見出された結合領域が Esco1、Esco2 の実際に機能している領域と同一であるかはこれまでの実験だけでは明らかではない。

Esco1、Esco2 はコヒーシンアセチル化酵素であるため、各々によってアセチル化された Smc3 (Smc3ac) を捕らえることで両因子の機能する細胞周期での時期や染色体領域の相違を直接的に解析したいと考えた。これまでに、当研究室では Smc3ac を特異的に認識するモノクローナル抗体を作出し (Nishiyama *et al.*, 2010)、ChIP-seq 法によって染色体上の Smc3ac 結合を捕らえることに成功している (Deardorff *et al.*, 2012)。そこで、本実験では Esco1 と Esco2 がともに発現する S 期で Smc3ac を標的とした ChIP-seq を実施し、両因子が S 期のどの時点で染色体上のどの領域のコヒーシンをアセチル化するのかを染色体全域について定量的に解析した。

まず、siRNA 法により Esco1、Esco2 をノックダウン (siEsco1, siEsco2) した HeLa 細胞をダブルチミジン処理によって S 期の 2 点 (early S、middle S 期) および G2 期に同調した。siEsco1、siEsco2 によりノックダウン対象のタンパク質が減少していることがウエスタンブロッティングで確認された (図 2 右上)。また、細胞周期の同調はフローサイトメトリー法で確認された (図 2 左)。

細胞内の Smc3ac タンパク質量は、通常条件の細胞では S 期で増加し G2 期にはわずかに減少することが見出された (図 2 右下)。アセチル化されたコヒーシンは生理的条件下ではクロマチン画分にのみみられることから、細胞内の総 Smc3ac タンパク質量は染色体上に結合する Smc3ac 量を表すと考えられる。Esco1、Esco2 の一方をノックダウンした細胞 (siEsco1、siEsco2) では、S 期、G2 期ともに Smc3ac 量の減少がみられた (図 2 右下)。Esco1、Esco2 は共に染色体上のコヒーシニアセチル化に寄与すると考えられた。さらに、Esco1、Esco2 双方のノックダウン細胞 (siEsco1&2) では、Esco1、Esco2 一方のノックダウン (siEsco1、siEsco2) を上回る減少がみられた (図 2 右下)。このことは、Esco1、Esco2 によるコヒーシニアセチル化が互いに代替できないことを示していた。なお、細胞内の総コヒーシンを表す SMC1 のタンパク質量は Esco1、Esco2 のノックダウンによってほぼ変動しなかった (図 2 右上)。

続いて、細胞周期やノックダウン条件の異なるこれらの細胞を用いて Smc3ac を標的とした定量的 ChIP-seq を実施した。同時に、コヒーシンサブユニット Rad21 抗体による ChIP-seq により染色体上に結合する総コヒーシンへの Esco1、Esco2 の影響も解析した。bin サイズ 100 bp にてピークコールを行い Rad21、Smc3ac の結合部位を同定した。第 8 番染色体の一部での Rad21、Smc3ac の結合分布の様子を図 6a に示す。

Rad21、Smc3ac 結合部位は、コントロール細胞で細胞周期を問わず約 3-4 万箇所存在していた。これらの結合部位の大部分 (7 割以上) は early S、middle S、G2 期のうち 2 つ以上の細胞周期点で共通する結合部位であった (図 6c)。単一の細胞周期でのみ抽出される結合部位は 2 つ以上の細胞周期で共通する結合部位に比べ有意性が低いものを含んでおり、これらは偽陽性の結合部位である可能性が考えられた。信頼性の高いコヒーシン結合部位のみに限定して Smc3 アセチル化を解析するため、3 つの細胞周期に共通する 28,074 箇所の Rad21 結合部位を抽出した (図 6c)。これらの結合部位で見られる Rad21 の ChIP-seq 濃縮は Rad21 ノックダウン (siRad21) によって消失し、

真の Rad21 結合領域であることが示された (図 6b)。よって、3 つの細胞周期に共通するこれらの Rad21 結合部位をコヒーシン結合部位として、以降の解析対象に定めることにした。

コヒーシン結合部位では Smc3ac の ChIP 濃縮がみられ、この ChIP 濃縮は siRad21 によって消失したことから、ChIP に用いた Smc3ac 抗体はコヒーシン結合部位で起こる Smc3 アセチル化を捕らえられていることが確認された (図 6b)。また、Smc3ac ChIP 濃縮の強度は個々のコヒーシン結合部位ごと、あるいは細胞周期ごとに異なっていた (図 6a、図 6b)。

ChIP-seq の定量性を、qPCR 法で実験的に定量した Smc3ac 量と Smc3ac ChIP-seq の cFE を比較することで検証した (図 7a)。コントロール細胞の 3 つの細胞周期において、8 箇所のコヒーシン結合部位での qPCR を行い以下の諸点を確認した。(i) Smc3ac 量について qPCR と ChIP-seq の実験結果には正の相関がみられた。(ii) 回帰直線は高い決定係数を示した。(iii) 回帰直線の傾きは 3 つの細胞周期点で極めて類似していた。特に (iii) は、マウス spike-in DNA を用いた正規化により実験条件の異なる細胞間で ChIP リード数の補正が適切になされたことを示していた。

### 3.5 コヒーシン結合部位のアセチル化には主に Esco1 が貢献する

第 8 番染色体の一部において Smc3ac ChIP-seq プロファイルを視覚的に比較した (図 6a)。コヒーシン結合部位において、Smc3ac の ChIP リード数は siEsco1 により大きく減少する一方、siEsco2 にはあまり影響を受けず、siEsco1&2 においては siEsco1 を上回る減少がみられた。コヒーシン結合部位に起こる Smc3 アセチル化は、Esco1 と Esco2 の両方に依存するアセチル化であることがわかった。

次に、この結果が染色体全域で起こる現象と一致するかを調べるため、コヒーシン結合部位内の Smc3ac ChIP 濃縮を Esco1、Esco2 ノックダウン前後において定量的に評

価した (図 7b)。ここでは、ピーク頂点から上流・下流 1.5 kb の領域を対象とし、マウス spike-in DNA により正規化したリードを用いて ChIP 前後でのリード数の比 (ChIP/input) を cFE として計算した。その結果、第 8 番染色体の一部で見られた傾向と一致し、cFE は siEsco1 によって減少することが見出された。このことは Esco1 がコヒーシン結合部位のアセチル化に寄与することを示しており、Esco1 自身が Rad21 結合部位に局在するという先行研究の報告と相容れるものである (Minamino *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2015)。

一方で、siEsco2 では siEsco1 ほどの顕著な cFE 減少はみられないものの、siEsco1&2 においては siEsco1 を上回る cFE 減少が見られた。このことから、Esco2 もコヒーシン結合部位のアセチル化に寄与するものの、その程度は Esco1 によるアセチル化に比べてずっと小さいと考えられた。この結果は qPCR 法により実験的に Smc3ac 量を定量することによっても示された (図 7c)。なお、Rad21 の cFE を同様に解析したところ、コヒーシン結合部位内での Rad21 ChIP 濃縮強度は Esco1、Esco2 のノックダウンによってほぼ影響されなかった (図 7d)。上述の Smc3ac の ChIP 濃縮の変動は染色体に結合するコヒーシン量の変化によるものではなく、コヒーシンのアセチル化量の変化として理解すべきことがわかった。

### 3.6 非限局的に染色体に結合するコヒーシンの可能性

ウエスタンブロッティング解析より S 期から G2 期初めの細胞で Esco2 が発現していることが確認された (図 2 右上)。また、Esco2 ノックダウン (siEsco2) により細胞内の Smc3ac が減少しその減少量は Esco1 ノックダウン (siEsco1) による減少量に匹敵するものであった (図 2 右下)。生理的条件下ではアセチル化されたコヒーシンはクロマチン画分にのみみられることから、Smc3ac の減少は染色体結合 Smc3ac 量の減少を表すと考えられた。

以上から、S 期から G2 期にかけて Esco2 は Esco1 とほぼ同程度にコヒーシンアセチル化に寄与していることが示唆される。しかし、3.5 においてピークとして抽出される限局的なコヒーシン結合部位での Smc3ac ChIP 濃縮に着目した際には、siEsco2 による Smc3ac 減少幅は siEsco1 に比べてずっと小さかった (図 6a, 図 7b, 図 7c)。この矛盾から、コヒーシンには限局的結合の他に異なる形態の結合領域が存在し、Esco2 は特に後者のアセチル化を担っている可能性が考えられた。

ゲノム学的手法に基づくコヒーシン研究では、これまで限局的な結合にのみ関心が向けられてきた。しかし、近年の生化学的な知見は染色体上に非限局的に局在するコヒーシンが存在することを示唆する。例えば、ヒト細胞での一分子解析により、DNA に結合したコヒーシンが DNA に沿って拡散運動する様子や、転写装置などの DNA モータータンパク質がコヒーシン分子を移動させる様子が観察されている (Davidson IF *et al.*, 2016; Kanke M *et al.*, 2016; Stigler *et al.*, 2016)。これらの知見は、コヒーシンには決まった染色体部位に結合するものとは別に、結合部位が細胞ごとにランダムな「非限局性結合」が存在する可能性と矛盾しない。

### 3.7 非限局的に染色体に結合するコヒーシンの検証

3.2 において、bin サイズを拡大して cFE 値を評価することで Esco2 が広範な染色体領域に分布することが示された (図 4a, 図 4c)。そこで、同様の手法で非限局的に局在するコヒーシンが捕らえられるかを検証した。Esco2 と異なりコヒーシンは染色体上に限局的な結合部位が 3 万個以上存在する。限局的結合部位内にマップされるリードが bin 内の cFE 値を変動させることを防ぐため、ここでは限局的結合部位以外の染色体領域に疎に分布するリードのみを用いて cFE 値を評価した。染色体全域において Rad21 の cFE 値を Rad21 のノックダウン (siRad21) 前後で比較したところ、限局的結合部位以外の染色体領域でも siRad21 により Rad21 の ChIP 濃縮が顕著に減少することが

判明した (図 8b)。

コヒーシスが限局的に結合する部位以外の染色体領域において Smc3ac ChIP 濃縮を Esco1 および Esco2 のノックダウン (siEsco1、siEsco2) 前後で比較した。Smc3ac cFE 値は siEsco2 によって siEsco1 と同程度、細胞周期点によっては siEsco1 以上に減少していた (図 9a 上)。siEsco1&2 では単独のノックダウンを上回る減少がみられた。この結果は qPCR 法による Smc3ac 定量によっても確かめられた (図 9a 下)。非限局的に局在するコヒーシンのアセチル化は Esco1、Esco2 双方に依存することが示唆された。

これまでのゲノム学的研究では、決まった染色体部位に結合するコヒーシンのみに焦点があてられ、限局的な結合部位以外の染色体領域に疎に分布する ChIP リードはバックグラウンドのノイズとして見なされてきた。しかし、定量的 ChIP-seq 法の採用により限局的な結合部位以外の染色体領域にもノックダウンによるコヒーシン減少が生じることが示された。これは、広範な染色体領域に疎に分散するコヒーシン結合が存在すること、非限局的に分布するこのコヒーシンこそが Esco2 のアセチル化標的であることを示唆するものであった。

### 3.8 Esco2 は複製と共役して染色体全域のコヒーシンをアセチル化する

3.3 では、Esco2 と複製ヘリケース MCM7 が共局在しながら複製の進行に伴い染色体上で結合領域を変化させることが見出された (図 4b, 図 5a)。このことから、Esco2 がアセチル化するコヒーシンもまた複製の進行に従って局在を変化させる可能性が示唆された。

先行研究においては、チミジンのアナログによって標識された新生鎖の領域と Smc3ac の結合領域を S 期最初期の細胞で比較し、両者のプロファイルが Esco1 ノックダウン細胞中で類似することを示している (Ivanov et al., 2017)。この結果は新生鎖領域で Esco2 がコヒーシンアセチル化を行うものと解釈された。しかし、細胞周期の一



時点の観察だけでは、実際に **Esco2** が機能する染色体領域が複製の進行に従って移動するとは結論できない。**Esco2** によるコヒーシニアセチル化が染色体全域に渡って行われるのか、あるいは特定の領域に偏ってなされるのかも定かではない。また、見出された **Esco2** の結合領域において **Esco2** が実際に機能しているかは不明である。

ここでは、非限局的に分布する **Smc3ac** に注目し **Esco1**、**Esco2** 依存のコヒーシニアセチル化が S 期から G2 期にかけて染色体上のどこでなされるのかを定量的に解析した。具体的には、複製の進行に伴う **Smc3ac** 結合の変化を解析するため、3.3 での解析と同様に複製進行度に対する **Smc3ac** cFE 値を染色体全域で解析した (図 9b)。

いずれの **Esco** タンパク質もノックダウンしていない細胞では、細胞周期の進行に伴い、複製タイミングの早い染色体領域から複製タイミングの遅い染色体領域へと順に **Smc3ac** ChIP 濃縮の上昇が起こっていた (図 9b)。early S 期の細胞では複製タイミングの最も早い領域 (マジェンダ) において **Smc3ac** cFE 値の上昇がみられた。続く middle S 期では中程度の複製タイミングの領域 (橙) においても cFE 値が上昇する一方、複製タイミングの最も早い領域では cFE 値が減少する様子が観察された。G2 期には複製タイミングの最も遅い領域 (青) にて cFE 値が上昇し、その他の領域では減少していた。si**Esco1** では、ノックダウン処理のない場合よりも全体的な **Smc3ac** ChIP 濃縮は減少したが、複製タイミングの順に **Smc3ac** ChIP 濃縮が上昇する点はノックダウン処理のない細胞と共通していた (図 9b)。

一方で、**Esco2** の存在しない条件下 (si**Esco2**、si**Esco1&2**) では **Smc3ac** パターンの経時的変化に顕著な違いが生じていた (図 9b)。いずれの細胞周期点においても複製の早い領域ほど **Smc3ac** ChIP 濃縮が強かった。これは、**Esco1** 依存的なコヒーシニアセチル化が複製タイミングの早い領域で恒常的に起こることを表しており、**Esco1** によるコヒーシニアセチル化は複製とは異なる機構で制御されていることを示唆する。

また、複製進行度に対する **Rad21** cFE の解析から、複製の早い染色体領域ほど **Rad21**

ChIP 濃縮が強いことが見出された。この分布傾向は細胞周期の進行によっても、Esco1、Esco2 のノックダウンによってもほぼ影響されなかった (図 10)。非限局性コヒーシンのうちアセチル化されていないものは細胞周期によって局在を変えることはないと考えられた。また、Esco1、Esco2 によるアセチル化は染色体に結合する総コヒーシンの局在には影響を与えないこともわかった。これは、Esco タンパク質によるアセチル化はコヒーシンのローディングには不要であるという知見と一致していた。

本実験より、非限局性コヒーシンのアセチル化について以下の諸点を結論づけた。(i) Esco2 は、複製の進行に伴い倍加した染色体領域にてコヒーシンアセチル化を行う。(ii) Esco2 依存的なコヒーシンアセチル化は染色体の全域でなされている。(iii) 一方で、Esco1 依存的なコヒーシンアセチル化は複製タイミングの早い染色体領域にて恒常的に観察されたため、複製反応と協調する反応ではない。Esco1 依存的なコヒーシンアセチル化は複製反応と共役するアセチル化ではない。Esco1 は MCM ヘリケースとの相互作用を示さないこと、MCM サブユニットの欠損細胞でも Esco1 依存のコヒーシンアセチル化が損なわれないことが示されている (Minamino *et al.*, 2018)。(iii) の結果はこの知見とよく一致するものである。

### 3.9 複製タイミングの遅い染色体領域のコヒーシンは主に Esco2 によってアセチル化される

非限局性のコヒーシン結合に対して、Esco1、Esco2 によるアセチル化の寄与の大きさを染色体領域ごとに比較した。複製タイミングにより三つにわけた染色体領域にて、細胞周期点ごとに Smc3ac cFE 値を比較した (図 9c)。その結果、複製タイミングの最も遅い領域 (青) において Esco1 と Esco2 の機能の違いが顕著に現れることが判明した。Esco2 の存在する条件下 (siCont、siEsco1) では middle S 期から G2 期にかけて複製タイミングの最も遅い領域の Smc3ac cFE 値が上昇した。一方で、Esco2 の存在し

ない条件下 (siEsco2、siEsco1&2) では Smc3ac cFE 値は低いまま G2 期に至っていた。この結果から、複製の遅い染色体領域では Esco1 によるコヒーシニアセチル化がなされず、実質的に Esco2 のみが機能していることが考えられた。一方複製の早い領域では、early S 期と middle S 期の細胞で Esco1 と Esco2 の双方によるコヒーシニアセチル化が行われていると考えられた。

### 3.10 S 期に起こるコヒーシニアセチル化の一部は G2 期までに染色体上から失われる

3.8 の複製進行度に対する非限局性 Smc3ac タンパク質の結合量解析では、Smc3ac の結合量は複製反応の前後で一度上昇した後、減少する様子が観察された (図 9b)。これと一致して、定量的ウエスタン法により細胞内の Smc3ac タンパク質量を解析した際にも、middle S 期から G2 期において Smc3ac タンパク質の染色体結合量に減少がみられた (図 2 右下)。

一般に、S 期に姉妹染色分体間の接着を確立したコヒーシンは DNA との結合が安定化されると考えられている (Ivanov & Nasmyth *et al.*, 2005; Gerlich *et al.*, 2006; Hearing *et al.*, 2008)。アセチル化は接着確立のための修飾なので、Smc3ac は染色体上で安定的に保持されることが予想された。しかし、実験結果は予想と反し一度アセチル化されても染色体上から失われるコヒーシが存在することを示唆していた。アセチル化されても接着確立に至らないコヒーシが存在する可能性が考えられた。

### 3.11 Esco2 依存にアセチル化されたコヒーシンの消長は G2 期の Sororin 結合に起因するのかもしれない

高等真核生物の接着確立には、コヒーシニアセチル化に加え Sororin のコヒーシンへの結合が必要であることが知られている (Lafont *et al.*, 2010; Nishiyama *et al.*, 2010)。

しかし、アセチル化されたコヒーシンの全てが Sororin と結合するのか、特定の染色体領域のコヒーシンのみが結合するのかは不明である。

既報の研究において、ダブルチミジン法で同調しリリース後 1 h, 2.5 h, 6.5 h (それぞれ early S、middle S、G2 期に相当) で回収した HeLa 細胞に対して Sororin を標的とした ChIP-seq 実験が行われている (Ladurner *et al.*, 2016)。この先行研究は本研究の Smc3ac ChIP-seq 実験と類似した実験条件を用いているため、解析結果の比較が可能と考えられた。この Sororin ChIP-seq 実験では spike-in DNA を使用していないため、ChIP リード総数の正規化をサンプル間で画一的に行った。細胞周期の異なる細胞では染色体に結合するタンパク質総量の変動に伴い ChIP される DNA 量に差が生じる可能性がある。これは ChIP-seq サンプル同士の FE 値にずれを生むため、サンプル間での ChIP 濃縮の多寡は比較できないことに留意しなければならない。一方で、同一サンプルでの染色体領域ごとの ChIP 濃縮を比較することは可能である。

複製進行度に対して非限局性の Sororin の ChIP 濃縮を細胞周期点ごとに解析した (図 11b)。非限局性の Sororin は S 期の間は複製タイミングの早い染色体領域ほど結合量が多いが、G2 期では複製タイミングのより遅い染色体領域で結合量が多くなるようであった。Sororin 結合分布のこの変化は、染色体全域を複製タイミングにより三つにわけ、非限局性 Sororin の ChIP 濃縮を同一の ChIP-seq サンプル内で比較することでより明らかとなった (図 11a)。Esco2 依存の非限局性 Smc3ac と同様に、Sororin は複製に伴って染色体に結合することが示唆された。ChIP-seq データ元の論文では Sororin のコヒーシンへの結合は倍加の完了した DNA 領域で生じていると解釈されている (Ladurner *et al.*, 2016)。また、コヒーシンへの Sororin の結合は複製に依存することが知られている (Rankin *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2007; Lafont *et al.*, 2010; Nishiyama *et al.*, 2010)。本研究の Sororin ChIP-seq の解析結果はこれらの知見とよく一致するものである。

この Sororin ChIP-seq 実験では Sororin ノックダウンなどのネガティブコントロールサンプルとの定量的比較ができなため、ChIP-seq のバックグラウンドレベルを正確に推定することができなかつた。よって、FE 値が 1 より大きい場合でも Sororin の結合があるとは言い切れない。しかし、ChIP-seq データ元の論文中では、G2 期の細胞で、複製タイミングの遅い領域として知られるヘテロクロマチンに Sororin が濃縮する様子が免疫蛍光によって顕微鏡下で観察されている (Ladurner *et al.*, 2016)。この知見から推論すると、G2 期の細胞では Sororin はヘテロクロマチンを含む複製タイミングの遅い染色体領域に結合していると考えられる。

複製タイミングの早い染色体領域では、Esco2 依存のコヒーシニアセチル化は S 期に一過性に上昇するものの G2 期に至るまでに元のレベルまで低下していた。これは、G2 期の細胞において複製タイミングの早い染色体領域では Sororin 結合が少ないことと関連しているかもしれない。複製完了後の細胞で Sororin を欠損させた場合に接着欠陥が生じることから、Sororin は接着の維持に必要であるとされている (Ladurner *et al.*, 2016)。複製タイミングの早い染色体領域では、Sororin が結合していないコヒーシスが G2 期までに脱離している可能性が考えられた。このことは、非限局性コヒーシスは複製反応に伴い染色体全域でアセチル化されるものの、このうち複製タイミングの早い染色体領域で起こるコヒーシニアセチル化は姉妹染色分体間の接着に繋がらないことを示唆していた。

### 3.12 一次元配列上で近接する 2 点の相互作用頻度の消長は Esco2 依存のコヒーシニアセチル化の消長と一致する

姉妹染色分体間接着を担うコヒーシスが染色体上のどの領域に存在するかを問うため、Hi-C データを利用した解析を試みた。Hi-C 法では、ホルマリンによる架橋反応を施したクロマチンを制限酵素で断片化し、その後リガーゼによる末端結合を行う。核内

で空間的に近位に配していた DNA 鎖の間にはリガーゼによる結合が起きる確率が高い。したがって、末端結合で生じたキメラ配列の出現頻度を計測することで、染色体上の任意の 2 点が核内で近接して存在する頻度（接触頻度）を計量することができる。

(Lieberman-Aiden *et al.*, 2009)。Hi-C 法は一般には染色体三次元構造について細胞集団での平均像を把握する際に用いられている。

そこで本実験では、Hi-C データ中に姉妹染色分体間の接着に由来する DNA 相互作用を見出せるかを検討した。Hi-C 法で得られたキメラ断片は両端の配列が次世代シーケンサーで決定され、この塩基配列情報の組（リードペア）がそれぞれリファレンスゲノム上にマップされる。姉妹染色分体間の接着に由来するリードペアは一次元配列上では極めて近い 2 点にマップされるため、コンタクトマトリクス（各々のリードペアのマップされる染色体上の位置を二次元平面の座標に対応させた行列）上では対角線付近に現れるはずである。G1 期と G2 期でコンタクトマトリクスを比較したところ、G1 期と比べ G2 期では染色体全域において対角線付近のリード頻度が増加していた（図 12 右）。これは、姉妹染色分体間の接着が S 期の間に確立することと一致しており、姉妹染色分体間接着に由来する DNA 相互作用が Hi-C データによって捕らえられている可能性が考えられた。

さらに、middle S 期と G2 期のコンタクトマトリクスを比較すると、対角線付近のリード頻度が強まる領域と弱まる領域が存在することがわかった（図 12 左）。興味深いことに、前者は複製タイミングの遅い染色体領域、後者は複製タイミングの早い染色体領域に対応していた。一次元配列上で近接する 2 点のリード頻度の消長は、Esco2 依存のコヒーシニアセチル化の消長と一致することが明らかになった。この結果は、Esco2 による非限局性コヒーシンのアセチル化のうち、特に S 期後期に複製される領域で起こるものが姉妹染色分体間の接着を担うという仮説を支持するものであった。

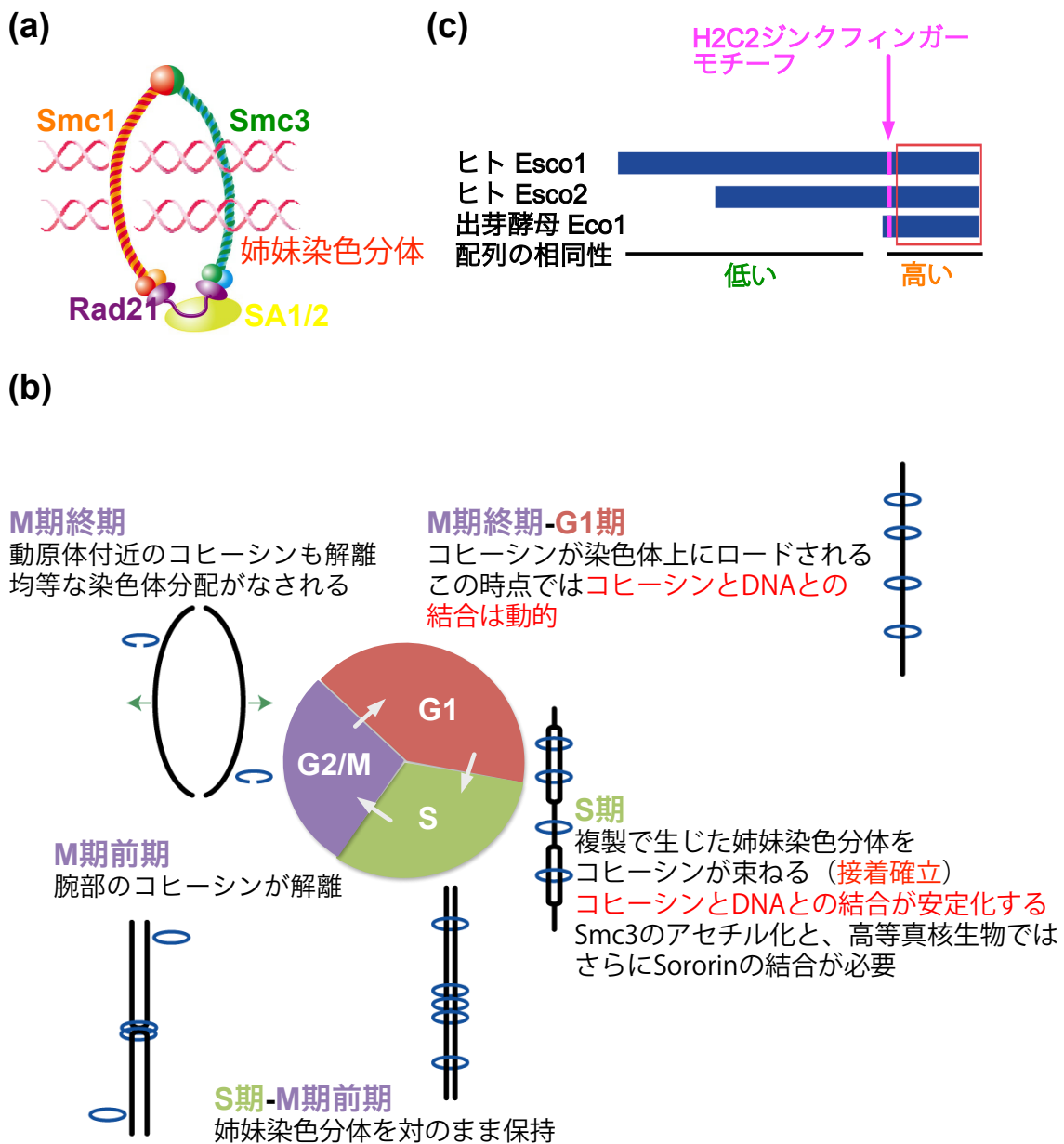


図 1 | コヒーシンのアセチル化を介した姉妹染色分体間接着

- (a) コヒーシン複合体の構造。(b) 染色体上コヒーシンの結合安定性の細胞周期制御。  
(c) Eco1 ファミリータンパク質の構造と配列保存性。

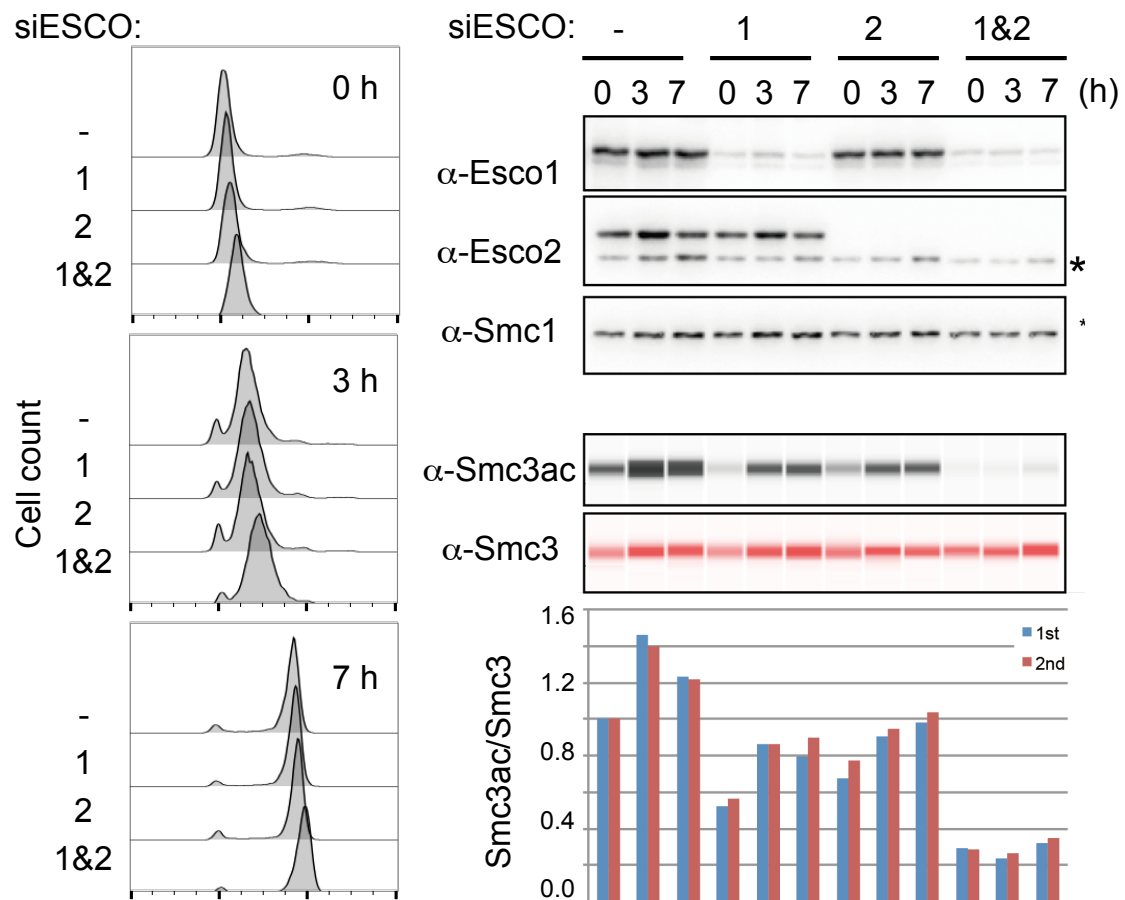
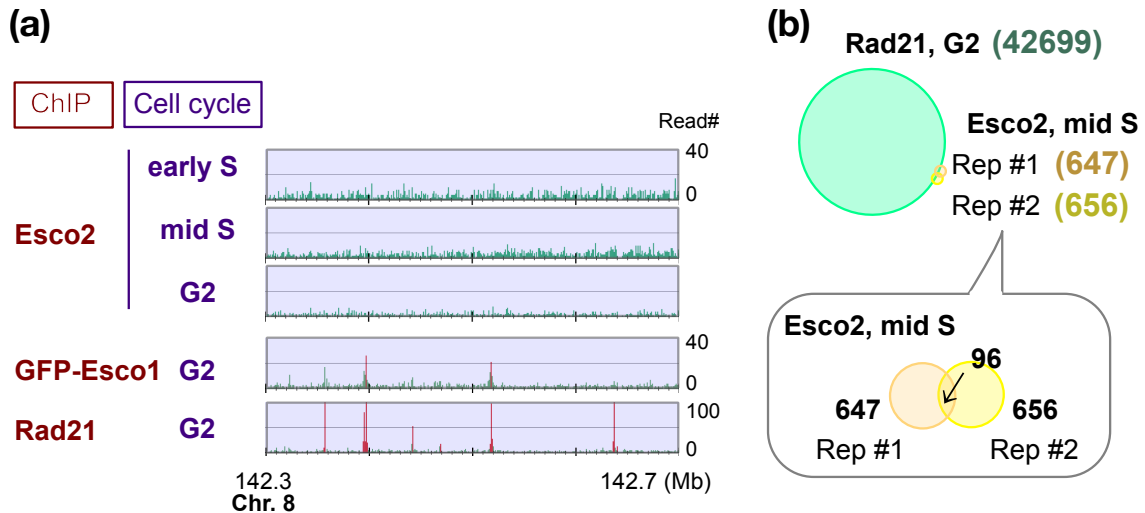


図 2 | 実験に用いた細胞の状態確認

(左) フローサイトメトリー法 (FACS) による細胞周期同調の解析。X 軸は染色体 DNA 含量を、y 軸は細胞数を表す。トランスフェクションをしない(-)、または Esco1、Esco2 の低分子干渉 RNA (siRNA) をトランスフェクションした HeLa 細胞をダブルチミジンブロック法により同調した。2 度目のチミジンリリース後、示した時間 (0 h、3 h、7 h) に細胞を回収した。(右上) ウェスタンブロッティング法による細胞内のタンパク質の解析。\*は非特異的なバンドを表す。(右下) 定量的ウェスタン法による細胞内の Smc3ac、Smc3 タンパク質の解析。Smc3ac と Smc3 はそれぞれ化学発光と蛍光で検出しバンドの強さを定量した。Smc3ac の定量値を Smc3 の定量値で正規化した値を Smc3 アセチル化量として棒グラフで表した。生理的条件下ではアセチル化されたコヒーシンはクロマチン画分にのみみられることから、細胞内の Smc3ac タンパク質量は染色体に結合する Smc3ac 量を表すと考えられる。

複数回行った実験のうちの一例を示す。全ての実験において、FACS による細胞周期同調の確認、ウェスタンブロッティング法によるノックダウンの確認を行った。

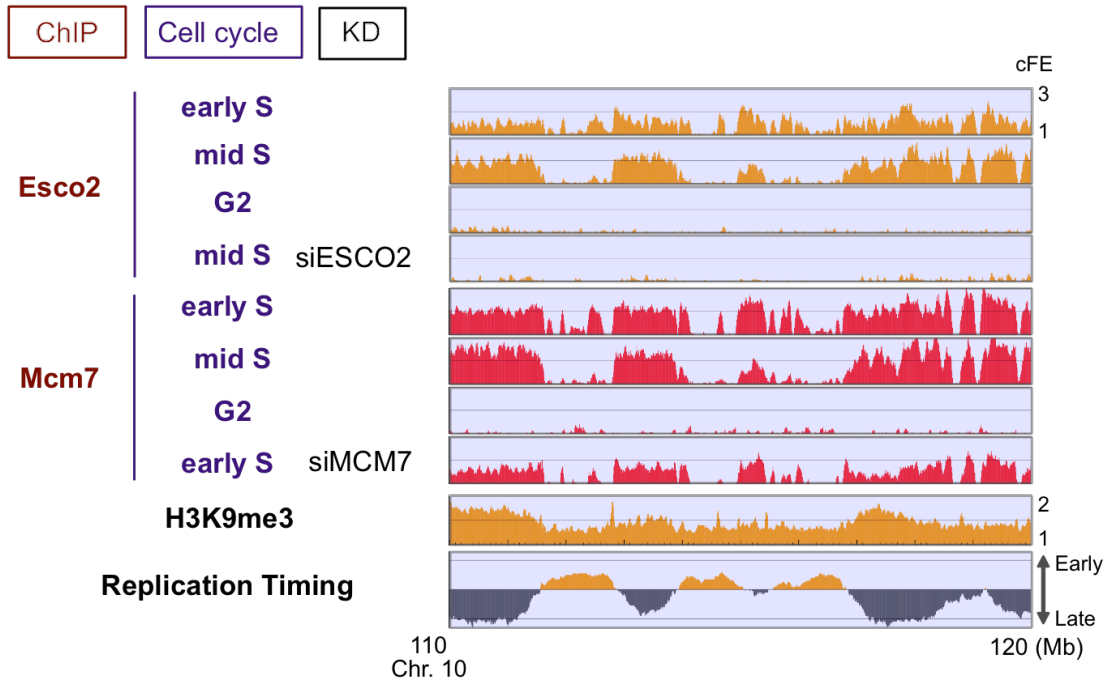




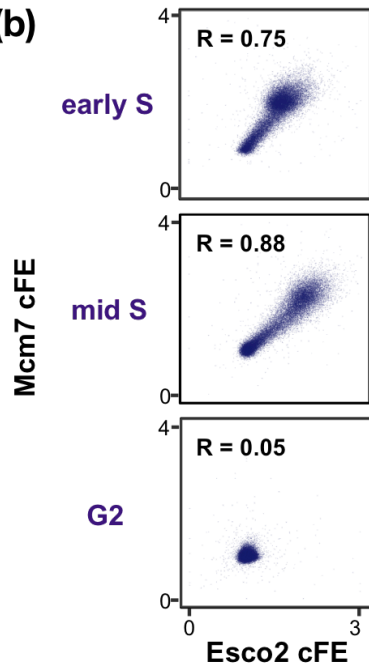
**図 3 | Esco2、MCM7 は染色体上で限局的な結合を示さない**

(a) 限局的結合に注目 (100 b bin で解析) した Esco2 の ChIP-seq プロファイル。ヒト第 8 番染色体の一部を示した (UCSC hg19 genome position 142.3-142.7 Mb)。比較のため、N 末端に GFP タンパク質を融合した Esco1 (Minamino et al., 2015)、およびコヒーシンサブユニット Rad21 の ChIP-seq プロファイルを併記した。y 軸は 100 万リードあたりのリード数 (RPM) を表す。ChIP リードが有意に濃縮する領域 (ピーク) を赤で示す。多数のピークがみられる Esco1 や Rad21 と異なり、Esco2 にはピークがみられない。(b) (上) Esco2 と Rad21 のピーク数の比較。括弧内の数字は染色体全域で検出されたピーク数を表す。Esco2 のピークは Rad21 と比較して非常に少なかった。(下) Esco2 のピークの数と重なり。同一条件 (mid S 期) の細胞を用いた 2 回の独立した実験を Rep #1, Rep #2 とした。数字は、抽出されたピーク領域が 1 bp 以上重なるピーク数を表す。Esco2 の限局的結合の再現性は低く、ほとんどが実験上のノイズであることを示唆している。

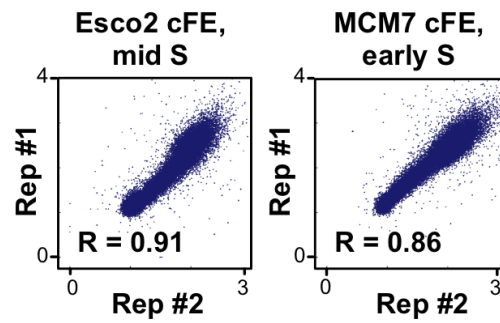
(a)



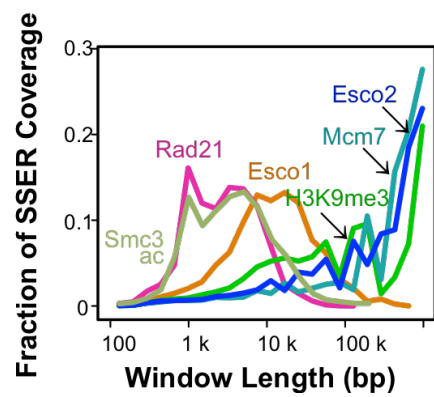
(b)



(c)



(d)



#### 図 4 | Esco2 は広域な染色体領域に非限局的に分布する

(a) 非限局的結合に注目 (10 kb bin で解析) した Esco2、MCM7 の ChIP-seq プロファイル。ヒト第 10 番染色体の一部を示した (UCSC hg19 genome position 110-120 Mb)。y 軸は算出した cFE 値 (calibrated fold enrichment, 結果に詳述) を用いて、さらに Esco2 と MCM7 各々に対し G2 期の cFE のゲノム全域での平均が 1 となるよう標準化した。H3K9me3 ChIP-seq および複製タイミング (replication timing) は ENCODE の公開データを用いた。(b) 非限局的に結合する Esco2、MCM7 ChIP-seq シグナルの染色体全域における相関。100 kb bin で算出した cFE を各細胞周期点で比較した。R はピアソン相関係数を示す。(c) 非限局的に結合する Esco2、MCM7 ChIP-seq シグナルの再現性。同一条件 (Esco2 は mid S 期、MCM7 は early S 期) の細胞を用いた 2 回の独立した実験を Rep #1, Rep #2 とし、100 kbp bin で算出した cFE を全ゲノム領域で比較した。R はピアソン相関係数を示す。(d) MUSIC というツール (Harmanci *et al.*, 2014) を用いて解析した、各ウインドウ幅にて検出される結合領域 (scale-specific enriched region, SSER) の頻度分布。コヒーシンや Esco1 のように強い ChIP-seq ピークを示すタンパク質と異なり、Esco2 や MCM7 ではウインドウ幅の大きい範囲に SSER が多く分布しており、広範な染色体領域に非限局的に結合するタンパク質であることを示唆する。

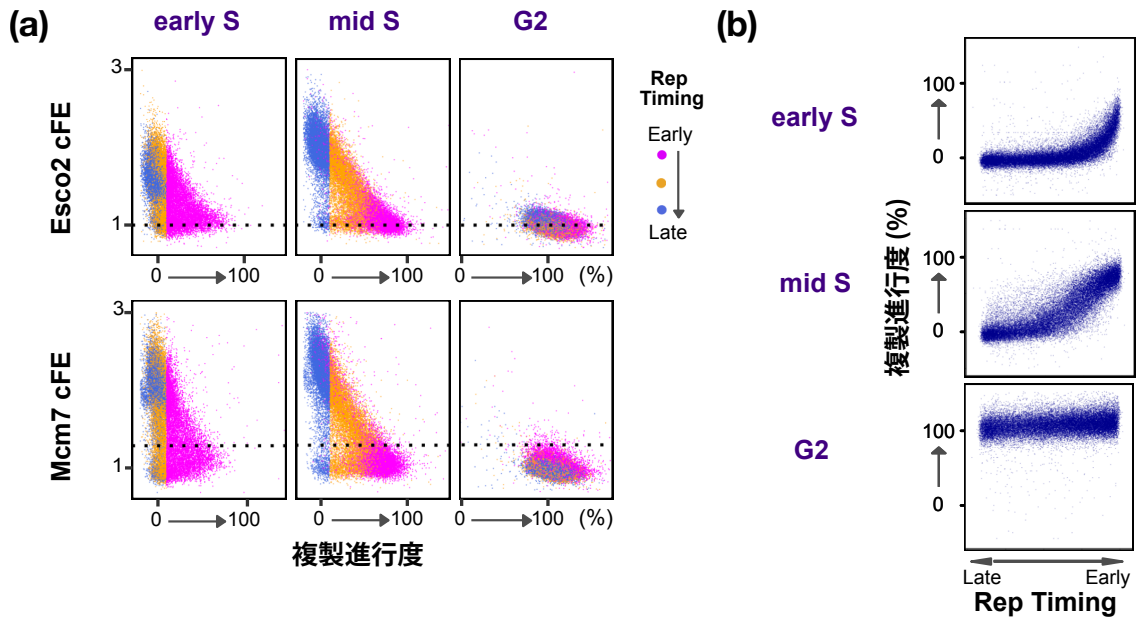
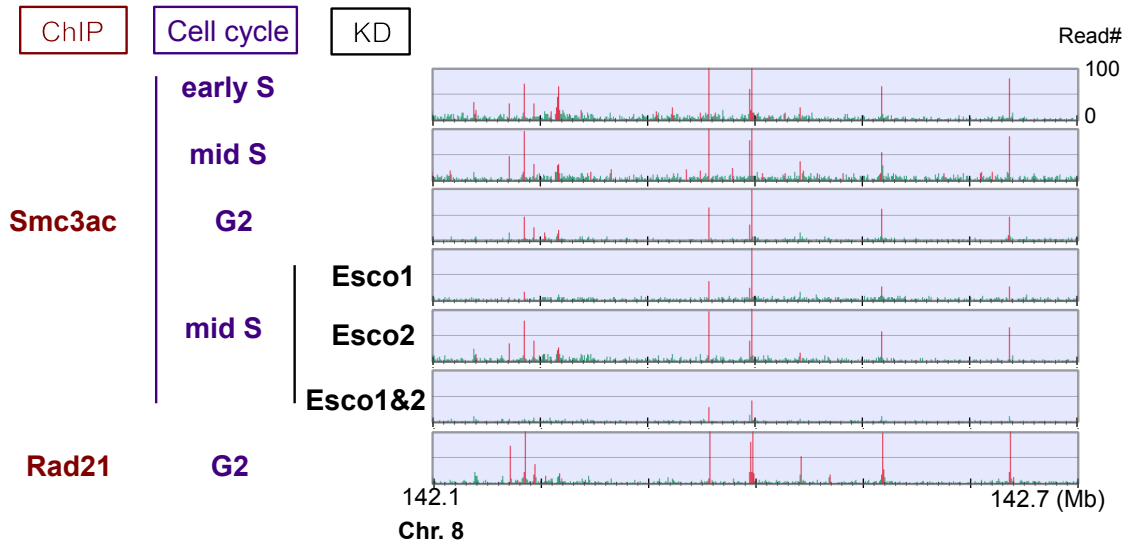


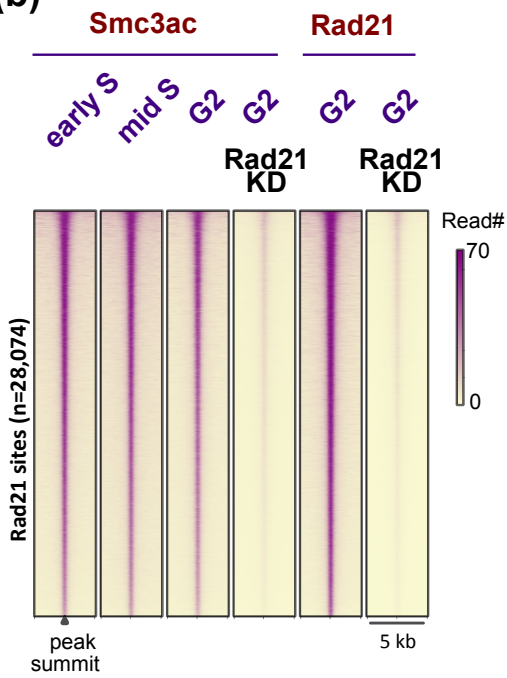
図 5 | Esco2、MCM7 の非限局性結合は未複製の染色体領域にみられる

(a) Esco2、MCM7 の非限局性結合の複製に伴う変化。x 軸は 100 kb bin 毎に分割した各々のゲノム領域での複製進行度を示す。G2/M 期の input リード数を基準とし、各細胞周期点での input リード数を 0-100%の間で正規化した。y 軸は 100 kb bin で算出した cFE を表す。Esco2 と MCM7 各々をノックダウンした際の cFE ゲノム平均値を点線で表した。siEsco2 細胞における Esco2 cFE のゲノム平均値 : 1.0、siMCM7 細胞における MCM7 cFE のゲノム平均値 : 1.3。各々のゲノム領域を複製進行度の増加が早い順に 3 つに区分し、色分けした。マジェンダ, early replicating domain ; オレンジ, middle replicating domain ; 青, late replicating domain。(b) ChIP-seq 実験の input リード数に基づいて算出した複製進行度の検証。x 軸は ENCODE の公開データによる複製タイミング (replication timing) を示す。

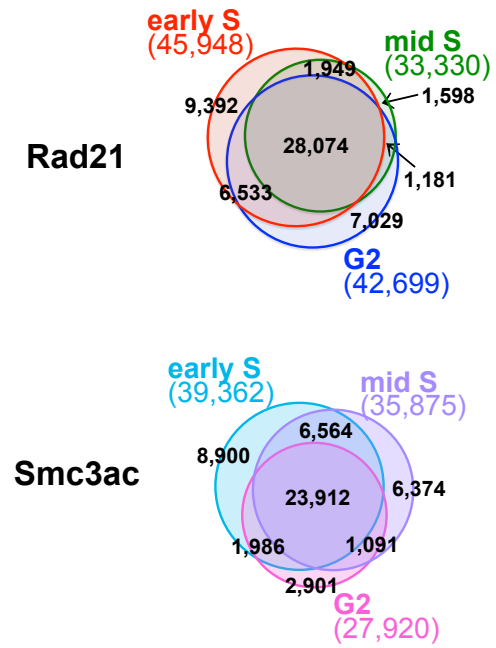
(a)



(b)



(c)



## 図 6 | 限局性コヒーシン結合におけるアセチル化の検出

(a) 限局的結合に注目 (100 b bin で解析) した Smc3ac の ChIP-seq プロファイル。ヒト第 8 番染色体の一部を示した (UCSC hg19 genome position 142.1-142.7 Mb)。y 軸は 100 万リードあたりのリード数 (RPM) を表す。ChIP リードが有意に濃縮する領域 (ピーク) を赤で示す。多数のピークがみられる Esco1 や Rad21 と異なり、Esco2 にはピークがみられない。(b) Esco ノックダウン処理をしていない細胞の 3 つの同調条件で共通して抽出される Rad21 ピーク (n=28,074) の信頼性の検証。各ピークは Rad21 ChIP-seq シグナル強度によって降順に並べた。ピークの頂点を中心として  $\pm 2.5$  kb 範囲での Rad21 ChIP-seq リード分布をヒートマップで描画した。(c) Rad21、Smc3ac のピーク数と重なり。Esco ノックダウン処理をしていない 3 つの同調条件にある細胞の ChIP-seq 実験で検出されるピークを比較した。括弧内の数字は染色体全域で検出されたピーク数を表す。ペン図内の数字は、検出されるピーク領域が 1 bp 以上重なるピーク数を表す。

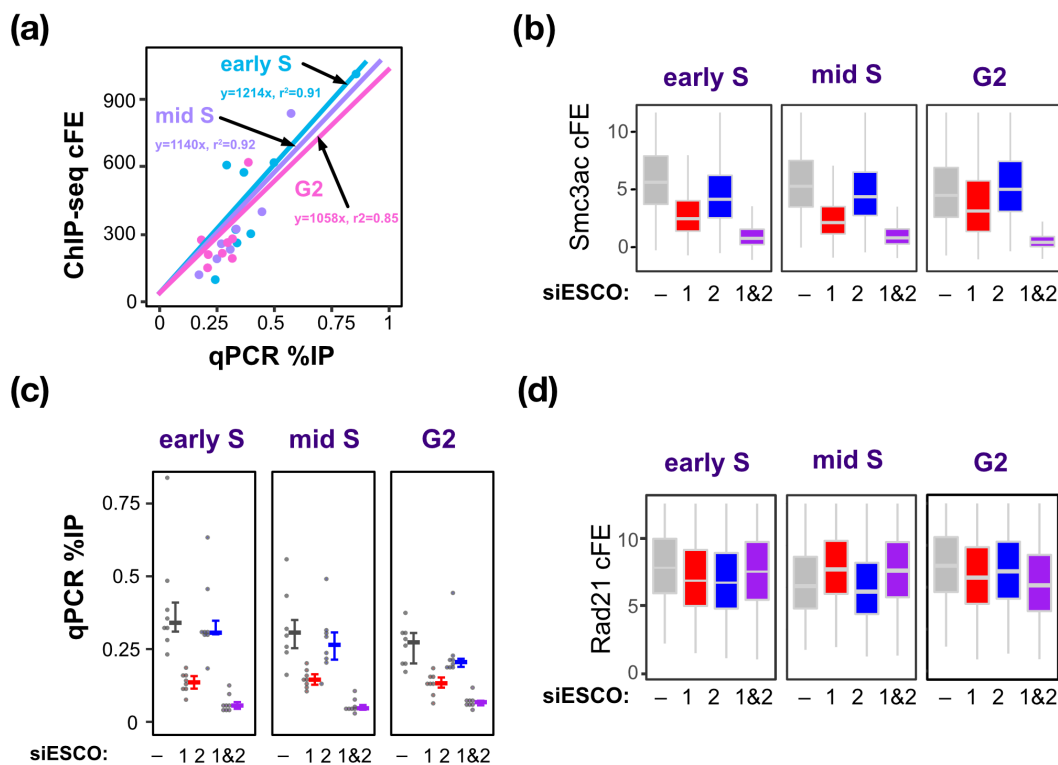


図 7 | 限局性コヒーシンのアセチル化は主に Esco1 によってなされる

(a) ChIP-qPCR 法による calibrated ChIP-seq 定量性の実験的検証。8 箇所のコヒーシン結合部位において qPCR 法により定量した Smc3ac 量 (%IP) に対し、対応するゲノム領域で算出した Smc3ac ChIP-seq cFE 値をプロットした。Esco ノックダウン処理をしていない細胞の 3 つの同調条件で qPCR と ChIP-seq の実験結果に正の相関がみられた。さらに、各回帰直線は高い決定係数 ( $r^2 > 0.9$ ) と類似した傾き (1,058-1,214) を示した。マウス spike-in DNA による正規化によって実験条件の異なる ChIP-seq 実験においてリード数が適切に補正されたことを示唆していた。(b) コヒーシン結合部位での Smc3ac 存在量と Esco ノックダウンによるその変化のゲノムワイド解析。Esco ノックダウン処理をしていない細胞の 3 つの同調条件で共通して抽出される Rad21 ピーク ( $n=28,074$ ) を対象に、ピークの頂点を中心として  $\pm 1.5$  kb 範囲での Smc3ac ChIP-seq の cFE 値を算出した。(c) コヒーシン結合部位での Smc3ac 存在量と Esco ノックダウンによるその変化の ChIP-qPCR 法による実験的検証。8 箇所のコヒーシン結合部位で Smc3ac 量 (%IP) を定量した。各コヒーシン結合部位で 3 回の技術的反復実験を行い、測定の実験値を点で示した。エラーバーは四分位範囲を、中央の太線は中央値を表す。(d) コヒーシン結合部位での Rad21 存在量と Esco ノックダウンによるその変化のゲノムワイド解析。Esco ノックダウン処理をしていない細胞の 3 つの同調条件で共通して抽出される Rad21 ピーク ( $n=28,074$ ) を対象に、ピークの頂点を中心として  $\pm 1.5$  kb 範囲での Rad21 ChIP-seq の cFE 値を算出し、箱髭図で示した。

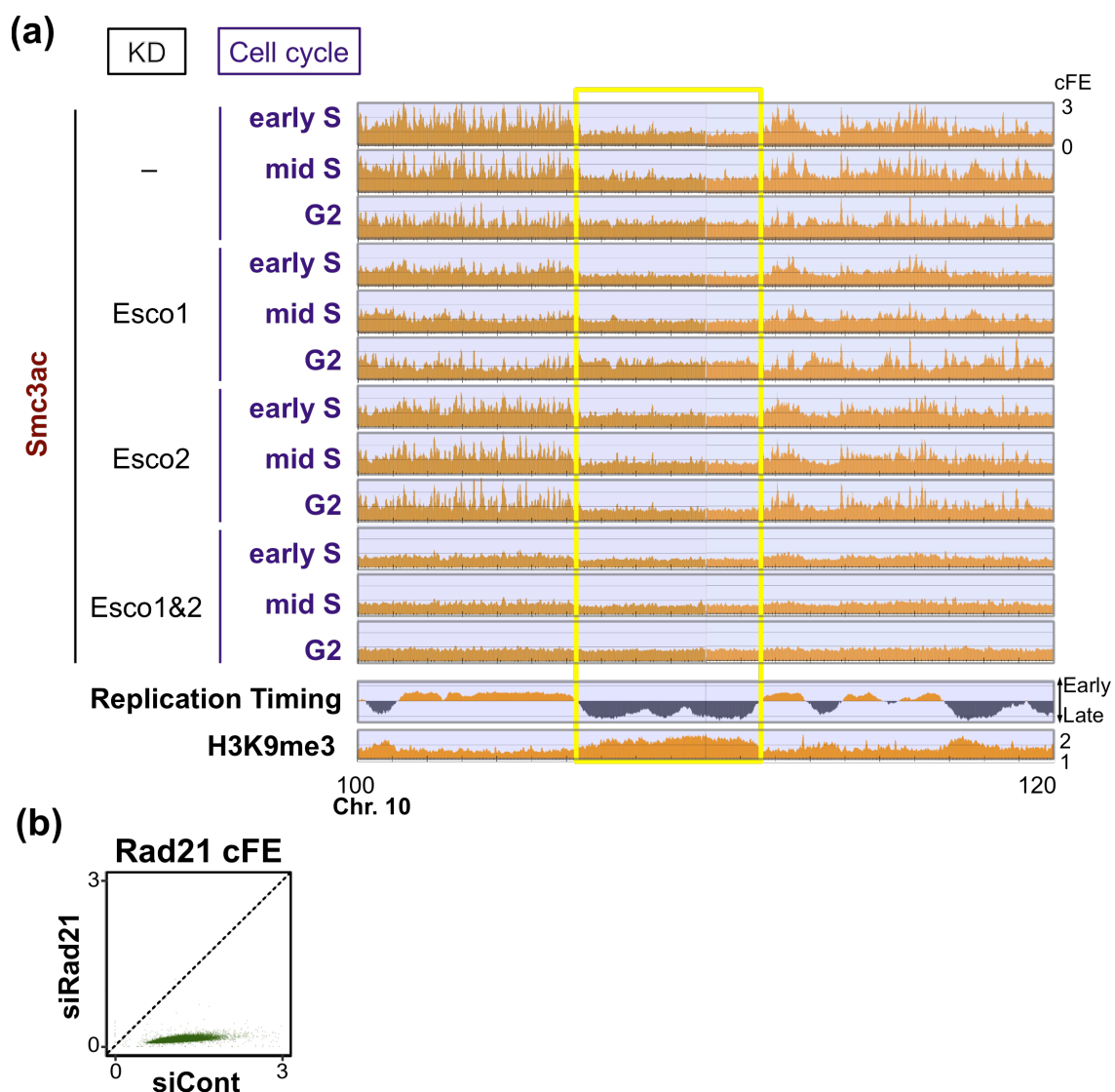
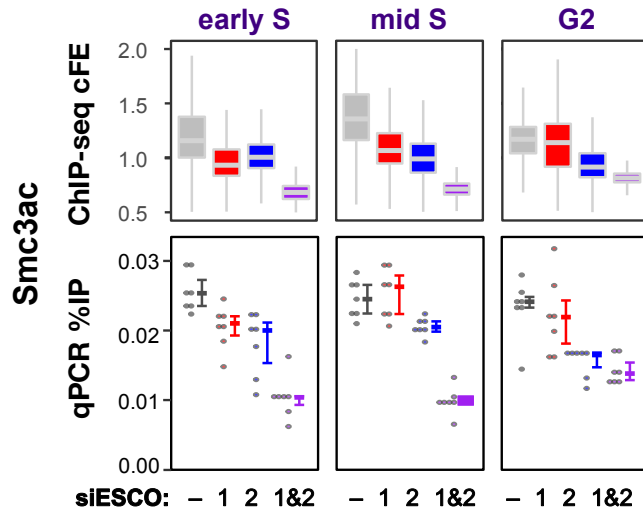


図 8 | 非限局性コヒーシン結合におけるアセチル化の検出

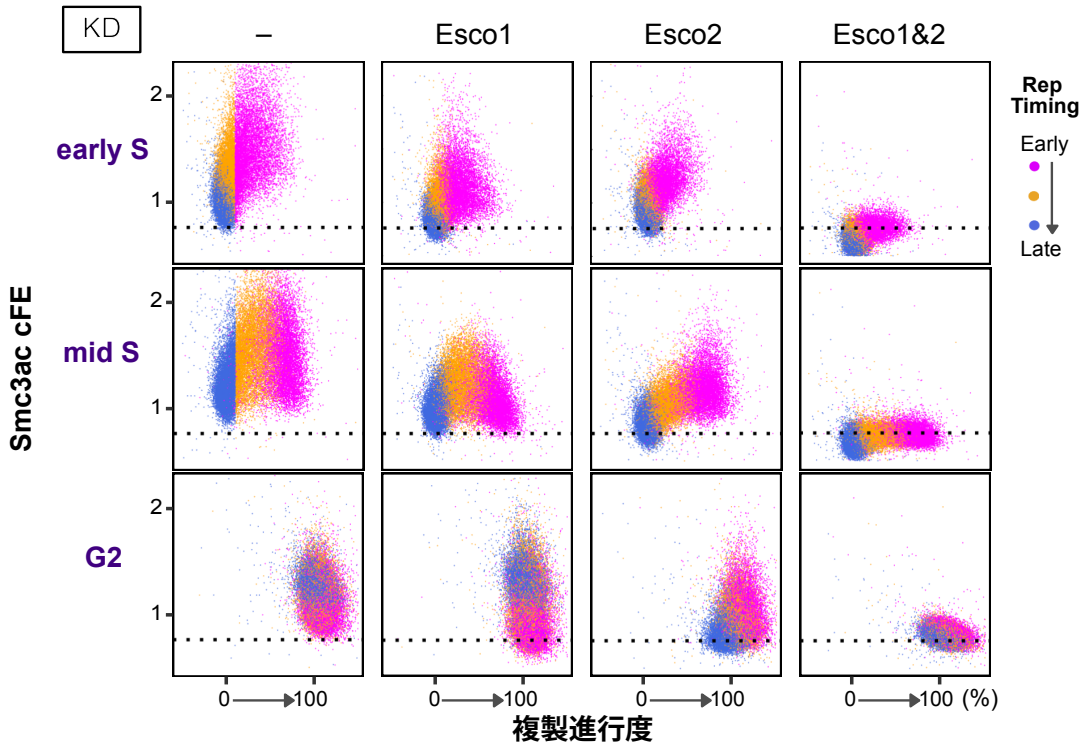
(a) 非限局的結合に注目 (10 kb bin で解析) した Smc3ac の ChIP-seq プロファイル。ヒト第 10 番染色体の一部を示した (UCSC hg19 genome position 100–120 Mb)。y 軸は算出した cFE 値 (calibrated fold enrichment, 結果に詳述) を用いて、さらに Esco ノックダウン処理をしていない early S 期の細胞において、複製の遅い領域での cFE 中央値が 1 となるよう標準化した。H3K9me3 ChIP-seq および複製タイミング (replication timing) は ENCODE の公開データを用いた。(b) 非限局的に染色体に結合するコヒーシンの検証。100 kbp bin にて算出したコヒーシンサブユニット Rad21 ChIP-seq の cFE を Rad21 ノックダウン (siRad21) の前後で比較した。cFE 値の算出には限局的なコヒーシン結合部位以外の染色体領域に疎に分布するリードのみを用いた。siRad21 により染色体上のすべての bin において Rad21 結合量が顕著に減少していた。



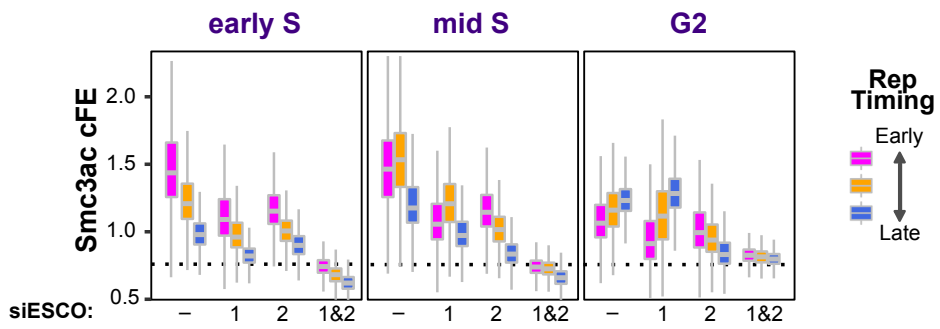
(a)



(b)



(c)



## 図 9 | Esco2 は複製に伴い非限局的なコヒーシンをアセチル化する

(a) (上) 非限局性 Smc3ac の結合量と Esco ノックダウンによるその変化の定量的 ChIP-seq 法によるゲノムワイド解析。100 kb bin で算出した Smc3ac ChIP-seq の cFE 値を細胞周期点ごと、Esco ノックダウンの有無によって比較した。cFE 値の算出には限局的なコヒーシン結合部位以外の染色体領域に疎に分布するリードのみを用いた。(下) 非限局性 Smc3ac の結合量と Esco ノックダウンによるその変化の ChIP-qPCR 法による実験的検証。限局的なコヒーシン結合部位以外の染色体領域から 7 箇所を選択し、Smc3ac 量 (%IP) を定量した。各染色体部位で 2 回の技術的反復実験を行い、測定の平均値を点で示した。エラーバーは四分位範囲を、中央の太線は中央値を表す。(b) 非限局性コヒーシンへのアセチル化量の複製に伴う変動。x 軸は 100 kb bin 毎に分割した各々のゲノム領域での複製進行度を示す。G2/M 期の input リード数を基準とし、各細胞周期点での input リード数を 0-100%の間で正規化した。y 軸は 100 kb bin で算出した Smc3ac ChIP-seq の cFE を表す。cFE 値の算出には限局的なコヒーシン結合部位以外の染色体領域に疎に分布するリードのみを用いた。Esco1、Esco2 双方をノックダウンした際の cFE ゲノム平均値を 3 つの細胞周期点で平均し (0.78) を点線で表した。各々のゲノム領域を複製進行度の増加が早い順に 3 つに区分し、色分けした。マジエンダ, early replicating domain ; オレンジ, middle replicating domain ; 青, late replicating domain。(c) 複製タイミングの異なるゲノム領域での、非限局性コヒーシンへのアセチル化量と Esco ノックダウンによるその変化のゲノムワイド解析。100 kb bin で算出した Smc3ac ChIP-seq の cFE 値を細胞周期点ごと、Esco ノックダウンの有無によって比較した。cFE 値の算出には限局的なコヒーシン結合部位以外の染色体領域に疎に分布するリードのみを用いた。

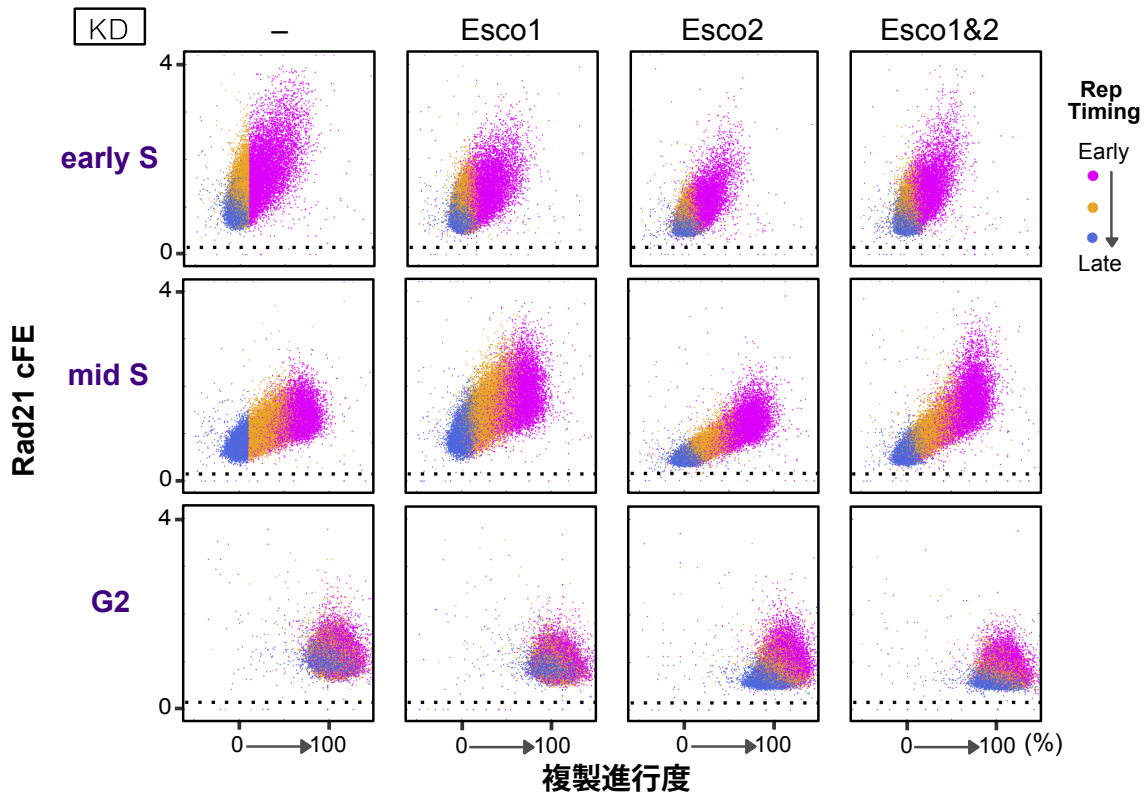


図 10 | 非限局性 Smc3ac の変動はコヒーシン結合の変動によらない

非限局的に結合する Rad21 の複製に伴う局在変化。x 軸は 100 kb bin 毎に分割した各々のゲノム領域での複製進行度を示す。G2/M 期の input リード数を基準とし、各細胞周期点での input リード数を 0-100% の間で正規化した。y 軸は 100 kb bin で算出した Rad21 ChIP-seq の cFE を表す。cFE 値の算出には限局的なコヒーシン結合部位以外の染色体領域に疎に分布するリードのみを用いた。Rad21 をノックダウンした際の cFE ゲノム平均値 (0.15) を点線で表した。各々のゲノム領域を複製進行度の増加が早い順に 3 つに区分し、色分けした。マゼンダ, early replicating domain ; オレンジ, middle replicating domain ; 青, late replicating domain。

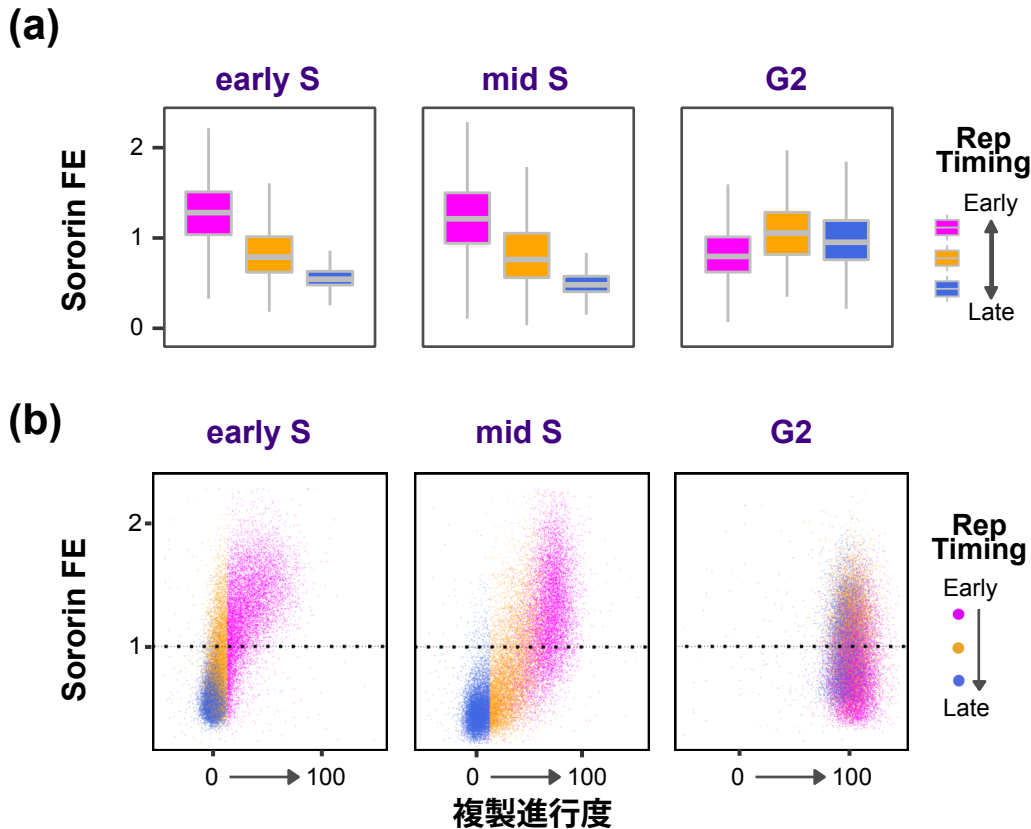
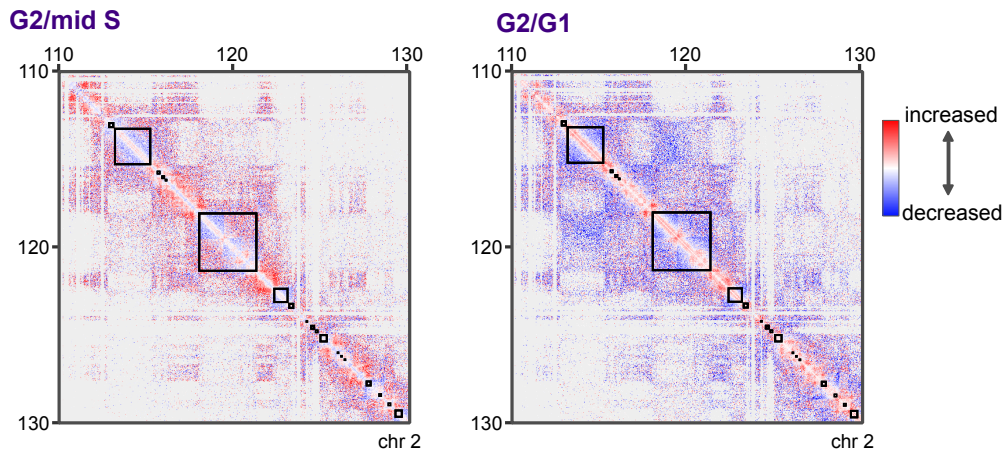


図 11 | Sororin の非限局性結合の細胞周期変動

(a) 複製タイミングの異なるゲノム領域での、非限局性 Sororin 結合量のゲノムワイド解析。ChIP 前の全染色体 DNA 断片 (input リード) を用いて ChIP 前後での ChIP/input 比 (fold enrichment, FE) を 100 kbp bin にて算出した。Sororin ChIP-seq は Ladurner *et al.*, 2016 らのデータを使用した。FE 値の算出には限局的な Sororin 結合部位以外の染色体領域に疎に分布するリードのみを用いた。(b) 非限局性 Sororin 結合量の複製に伴う局在変化。x 軸は 100 kb bin 毎に分割した各々のゲノム領域での複製進行度を示す。G2/M 期の input リード数を基準とし、各細胞周期での input リード数を 0-100% の間で正規化した。y 軸は Sororin ChIP-seq (Ladurner *et al.*, 2016) の ChIP 前の全染色体 DNA 断片 (input リード) を用いて ChIP 前後での ChIP/input 比 (fold enrichment, FE) を 100 kbp bin にて算出した。FE 値の算出には限局的な Sororin 結合部位以外の染色体領域に疎に分布するリードのみを用いた。各々のゲノム領域を複製進行度の増加が早い順に 3 つに区分し、色分けした。マゼンダ, early replicating domain; オレンジ, middle replicating domain; 青, late replicating domain。



**図 12 | Hi-C 法に基づいた姉妹染色分体間接着の可視化**

染色体上の任意の 2 点間の相互作用頻度の G1 期から mid S 期における変化。ヒト第 2 番染色体の一部 (UCSC hg38 genome position 110–130 Mb) を解像度 50 kb で示した。複製タイミングの遅い領域を四角で囲った。コンタクトマトリクスの上側と左側に対応する染色体一次元上の座標を示した。G1 期の細胞の正規化したリード頻度に対して mid S 期の細胞での正規化したリード頻度が増加するピクセルを赤で、減少するピクセルを青で示した。

表 1 | ChIP-qPCR プライマーペア一覧

Target site	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	Chromosome position (UCSC hg19)
constitutive Rad21 peak #1	AATGCCCAGTGCCCAAATG	TGGCGTCAGTTACCCAAAAG	chr3: 119901853-119901972
constitutive Rad21 peak #2	GCAGTGTGCTTCATTCACAGG	AAGGGATGCCAACGAACAAC	chr1: 176529142-176529282
constitutive Rad21 peak #3	ACCCAAAAGCTGCCTATGTC	AGCTCTGAAAGGGAATGTGC	chrX: 32549072-32549144
constitutive Rad21 peak #4	TGTTGACATGTGCAGCTCAAG	TTGGATAGCTTGTTCCTTTGC	chr2: 54931731-54931835
constitutive Rad21 peak #5	TGTAGCAATGCTCTCTCACTCC	TGGGTCACTCACTTGGTATCAC	chr15: 37426978-37427078
constitutive Rad21 peak #6	GCAAGGCTCTACCGTCATT	CCTTCTCTCAGAAGCCGTG	chr12: 40501367-40501558
constitutive Rad21 peak #7	TAGACGGAGCTGGAAGGAAA	AGGGACAGTCACCACCTTTG	chr12: 53278667-53278827
constitutive Rad21 peak #8	AAACCTCTGAGCTATAATGCTG	CTGGGTGCAAGCCACT	chr17: 32688528-32688678
peak-free #1	AGGTGGCTGCTTTGTAGTG	AGACTGGCAACTTCTGGGTT	chr19: 22539402-22539538
peak-free #2	CCCCTGTCACTGTATTGTGAAG	AGCAAGACACATGGCAAAGC	chr5: 37854706-37854795
peak-free #3	GGAATTAGGGAGAGAGAATGCAC	TGGTGCCACCATTATCCTAAGC	chr6: 57473502-57473579
peak-free #4	ACTTCCAGAGAAAATGGGGATG	ATGCCATGTTGCTCAGAGG	chr5: 38531542-38531643
peak-free #5	TTGCTGGCAGTGCTTCATAC	TGGTGCCAAGAAGTTGGAG	chr11: 94553607-94553702
peak-free #6	ACTTGGTGTGCTCTCTTAGG	TGGTAATGACGGCCTCAAC	chr12: 61952396-61952469
peak-free #7	TGTGACCATCTCTAATGAATGC	ACACTGTTATGACTGCTCTGTTG	chr21: 26544404-26544489

表 2 | ChIP-seq データの統計

Sample description	#Total reads	#Reads mapped to hg19 only	#Reads mapped to mm10 only	Occupancy ratio	#Reads after call	#Uniquely mapped reads	#Non redundant reads
input, early S	31481447	25223249	5283391	1.000	20000000	19238863	18915918 (98.3%)
input, mid S (rep1)	31711409	26212401	4563281	1.000	20000000	20123300	19791359 (98.4%)
input, G2	30553076	26250390	3335914	1.000	20000000	20000988	19662905 (98.3%)
input, mid S (rep2)	38778441	31099022	6506526	1.000	20000000	24001652	22953766 (95.6%)
input, mid S, siEsco2	37394101	29774591	6504199	1.000	20000000	22972331	21974205 (95.7%)
Esco2, early S	27996629	23279782	3817457	1.277	25547386	17696187	17342588 (98.0%)
Esco2, mid S (rep1)	38969551	33177654	4466626	1.293	25862261	25038416	24418332 (97.5%)
Esco2, G2	31696139	26775804	3879427	0.877	17542198	20397848	19951556 (97.8%)
Esco2, mid S (rep2)	36006885	30523784	4249227	1.503	30058055	22935418	21894883 (95.5%)
Esco2, mid S, siEsco2	36256926	28158080	7016431	0.877	17533346	21519983	20504042 (95.3%)
input, early S (rep1)	45674833	33653207	10516598	1.000	20000000	25090223	24900643 (96.9%)
input, mid S	40055798	30208377	8625252	1.000	20000000	23764507	22522210 (97.0%)
input, G2	36965855	29742911	6025588	1.000	20000000	22999839	21981699 (96.9%)
input, early S (rep2)	43454938	32152642	9893074	1.000	20000000	24561059	24132572 (98.3%)
input, early S, siMCM7	45323216	34002754	9766671	1.000	20000000	26021931	25561183 (98.2%)
MCM7, early S (rep1)	42735303	37214867	4013755	2.897	57948797	26839777	26868918 (96.2%)
MCM7, mid S	36001906	31298569	3405543	2.624	52482258	25038416	22569833 (96.3%)
MCM7, G2	37824330	32565071	4027510	1.638	32761318	25090223	23547519 (95.3%)
MCM7, early S (rep2)	44295023	39446907	3303192	3.674	73489235	29490505	28878698 (97.9%)
MCM7, early S, siMCM7	46967096	39932928	5368054	2.137	42734314	29709922	28892989 (97.3%)
input, early S, siControl	35919675	26600446	8301779	1.000	20000000	24147689	23575667 (97.6%)
input, early S, siEsco1	38290301	28536989	8667788	1.000	20000000	21833236	21503342 (98.5%)
input, early S, siEsco2	36797528	27003723	8730474	1.000	20000000	20596168	20289076 (98.5%)
input, early S, siEsco1&2	38606254	27930385	9041249	1.000	20000000	21347956	21011240 (98.4%)
input, mid S, siControl	35133512	27095054	7096043	1.000	20000000	20847488	20367681 (97.7%)
input, mid S, siEsco1	38476897	29788846	7656547	1.000	20000000	22896392	22354015 (97.6%)
input, mid S, siEsco2	36118713	27641998	7495399	1.000	20000000	21236700	20731755 (97.6%)
input, mid S, siEsco1&2	36856543	27718462	8145525	1.000	20000000	21300488	20805987 (97.7%)
input, G2, siControl	38714248	31694280	5884685	1.000	20000000	24147689	23575667 (97.6%)
input, G2, siEsco1	36494541	29546652	5877108	1.000	20000000	22529417	22000377 (97.7%)
input, G2, siEsco2	41022955	32870452	6977431	1.000	20000000	25090223	24488557 (97.6%)
input, G2, siEsco1&2	38903183	31149943	6619362	1.000	20000000	23764507	23193266 (97.6%)
input, G2/M, siControl	35768332	30383357	4269575	1.000	20000000	22896392	21232611 (88.6%)
input, Asyn, siRad21	40846457	31771424	7900311	1.000	20000000	24994384	23343203 (96.3%)
Rad21, early S, siControl	37558919	30452910	6071724	1.565	31306104	24279870	23556762 (97.0%)
Rad21, early S, siEsco1	40178440	31397744	7671301	1.243	24863345	24994384	24255243 (97.0%)
Rad21, early S, siEsco2	41266427	30263287	9877205	0.990	19794228	24323300	23489192 (96.6%)
Rad21, early S, siEsco1&2	40015488	30609752	8291363	1.195	23900962	24706253	23848970 (96.5%)
Rad21, mid S, siControl	38183615	30681683	6430558	1.250	24991178	24232366	23343203 (96.3%)
Rad21, mid S, siEsco1	39109826	32964907	5092867	1.664	33273523	26195406	25196584 (96.2%)
Rad21, mid S, siEsco2	37906624	28621286	8287712	0.936	18728794	22998859	22094947 (96.1%)
Rad21, mid S, siEsco1&2	37780571	29907185	6899804	1.274	25475266	24098935	23100167 (95.9%)
Rad21, G2, siControl	39002938	33260667	4569576	1.352	27033226	26373479	25312133 (96.0%)
Rad21, G2, siEsco1	38134875	31507107	5490140	1.142	22830241	24900458	23950592 (96.2%)
Rad21, G2, siEsco2	38192044	31188591	5989910	1.105	22105245	25227730	24122935 (95.6%)
Rad21, G2, siEsco1&2	38190087	30189209	6960252	0.922	18433833	24245768	23308024 (96.1%)
Rad21, Asyn, siRad21	41740686	15140785	25388196	0.148	2965883	12236141	12318542 (90.4%)
Smc3ac, early S, siControl	41366732	33323096	6383352	1.629	32584330	26213713	24390500 (93.0%)
Smc3ac, early S, siEsco1	40627452	31123950	7792496	1.213	24263210	24150999	22577892 (93.5%)
Smc3ac, early S, siEsco2	40088867	30770312	7557174	1.316	26327926	24079562	22534210 (93.6%)
Smc3ac, early S, siEsco1&2	40259257	27476464	10741597	0.828	16560502	21299756	19253381 (90.4%)
Smc3ac, mid S, siControl	38197108	32302958	4631611	1.827	36531410	25150144	24023088 (95.5%)
Smc3ac, mid S, siEsco1	40278194	32734342	6253823	1.345	26907125	25539143	24367359 (95.4%)
Smc3ac, mid S, siEsco2	39916094	31964012	6495771	1.334	26686149	25163106	23049642 (91.6%)
Smc3ac, mid S, siEsco1&2	43998490	30796290	10452142	0.866	17317016	23965357	21232611 (88.6%)
Smc3ac, G2, siControl	40540435	34757866	4338511	1.487	29749846	26839777	25631007 (95.5%)
Smc3ac, G2, siEsco1	40993679	34331438	4824845	1.415	28307011	26275876	23083836 (87.9%)
Smc3ac, G2, siEsco2	39913920	32753298	5524340	1.259	25170654	25808607	23857314 (92.4%)
Smc3ac, G2, siEsco1&2	40109527	31699433	6999559	0.962	19247294	24250973	22973555 (94.7%)
Smc3ac, Asyn, siRad21	35621020	22055338	12236141	0.448	8964101	17696187	17342588 (98.0%)

## 4. 総合討論

### 4.1 非限局性の結合を同定する手法の確立

本研究では、従来の ChIP-seq 解析方法では見出せない、広範な染色体領域に非限局的に分布するタンパク質の結合（非限局性結合）領域を同定する手法を確立した。非限局性結合の同定には、ゲノム上に疎に分布する ChIP リードをバックグラウンドのノイズと区別する必要性があった。本研究では、(i) Bin を拡大して統計的検出力を高めること (ii) ChIP-seq 実験におけるバックグラウンドノイズの強度をネガティブコントロールサンプルから推定するため定量的 ChIP-seq 法を利用すること、の 2 点の工夫によって非限局性結合領域の同定に成功した。なお、非限局性結合領域では当該タンパク質の結合頻度が小さく ChIP-qPCR 等の手段によって定量することが困難である。非限局性のタンパク質結合のゲノムワイドな解析には定量的 ChIP-seq 解析が現在のところ唯一の方法であると考えられる。

### 4.2 Esco1 と Esco2 の染色体結合の違い

非限局性結合の同定手法の確立により、本研究では Esco1 と Esco2 との染色体結合には、細胞周期や分布形態において顕著な違いがあることが明らかになった。限局的なコヒーシオン結合部位に恒常的に局在する Esco1 に対し、Esco2 は各々の細胞周期点の時点で未複製の染色体領域において MCM7 と共に非限局的に局在した。

Esco1 と Esco2 は N 末のアミノ酸配列が異なる (Hou *et al.*, 2005)。この特異的領域において Esco1 は Pds5 と、Esco2 は MCM とそれぞれ結合し、この結合に依存して各因子は染色体上にリクルートされることが知られている (Higashi *et al.*, 2012; Minamino *et al.*, 2015; Ivanov *et al.*, 2018)。両因子の N 末の配列特異性が、各々のリクルート機構の違いを生み出し、上述の染色体上の結合分布の違いに繋がると考えられる。



### 4.3 Esco1 と Esco2 の染色体上機能領域の違い

本研究ではまた、非限局性のコヒーシン結合が染色体上に存在することを見出した。さらに、Esco2 はこの非限局性のコヒーシンに対して全染色体領域にわたり複製と共役したアセチル化を行うことを示した。Esco2 が複製と共役してコヒーシンアセチル化を行うことはこれまでの研究からも示唆されてきたが、経時的な観察によって Esco2 依存的な Smc3ac 結合が複製に伴って局在を変化させる様子を全染色体領域において実際に捉えたのは本研究が初めてである。

ゲノム学的手法による Esco2 依存のコヒーシンアセチル化領域と新生鎖領域との比較は、先行研究においても行われている (Ivanov et al., 2017)。しかし、この論文においては Esco1、Esco2 依存のコヒーシンアセチル化領域の違いが明確ではなく、複製と共役したアセチル化が Esco2 固有の機構であることを示すのに十分ではない。これは、early S 期の細胞での ChIP-seq 解析結果を比較していたためと考えられる。すなわち、early S 期の細胞において Esco2 は複製タイミングの早い領域でコヒーシンアセチル化を行っているが、一方で Esco1 は複製タイミングの早い領域を恒常的にアセチル化しているため、この時期の ChIP-seq プロファイルの比較は両因子の機能領域の違いを見出すには適切ではなかったと考えられる。

### 4.4 Esco1 と Esco2 の染色体上機能領域の違い

先行研究において、ロバーツ症候群の患者細胞や Esco2 欠損細胞のセントロメア周辺領域でコヒーシンアセチル化と姉妹染色分体間接着に欠損がみられることが示されている (Whelan et al., 2012; Higashi et al., 2012; Ivanov et al., 2017)。しかし、なぜこの染色体領域で特異的に表現型が観察されるのかは説明されていなかった。

Esco2 が複製と共役したコヒーシンアセチル化を行うのであれば、こうした不全は染

染色体全域において観察されても不思議はない。セントロメア周辺の領域には複製とは独立した Esco2 のアセチル化機構が働いている可能性や、Esco2 依存のアセチル化量がセントロメア周辺領域で特に多いなどの複数の可能性も考えられていた。

本研究からはこれらの仮説とは異なるモデルが導かれた。経時的な観察によって各細胞周期での染色体領域ごとのコヒーシニアセチル化量を定量比較し、(i) Esco2 依存のコヒーシニアセチル化は染色体全域で起こること、(ii) Esco2 依存のコヒーシニアセチル化量には染色体領域ごとに大きな差はないこと (iii) Esco1 依存のコヒーシニアセチル化は複製タイミングの早い染色体領域に偏っていること、の 3 点が明らかとなった。つまり、複製タイミングの遅い領域では Esco1 がコヒーシニアセチル化を代替できず Esco2 が特異的に機能することが見出された。一般に、セントロメア周辺領域は代表的なヘテロクロマチン領域であり、ヘテロクロマチン領域は複製タイミングが遅いことが知られている。本研究の結果は、セントロメア周辺領域で Esco2 が重要である理由を明確に説明できるものである。また、これまでの知見を拡張し、Esco2 固有のコヒーシニアセチル化はセントロメア周辺領域に限らず、S 期の後半に複製される領域一般で行われていることが示されたと言える。

#### 4.5 Esco2 の結合領域と染色体上機能領域の違い

本研究から、Esco2 の結合領域は複製が未完了の染色体領域であり、一方 Esco2 依存のコヒーシニアセチル化が見出されるのは複製の完了した染色体領域であることがわかった。この結果は、染色体上において Esco2 の局在領域と機能領域が一致しないことを意味している。

染色体に結合する Esco2 は複製反応の前後で初めて活性化し、近傍の染色体領域でコヒーシニアセチル化するのではないかと推測された。あるいは、Esco2 は MCM ヘリケースと共に染色体上を移動し、既に染色体に結合しているコヒーシンに出会うとア

セチル化を行うのかもしれない。

#### 4.6 コヒーシと DNA との結合安定化におけるコヒーシアセチル化と Sororin との連携機構

本研究の結果は、染色体上の非限局性 Smc3ac 結合には大きく分けて 2 種類が存在することを示していた。一つは、S 期に一過性に増加するものの G2 期までには失われてしまう Smc3ac 結合であり、これは複製タイミングの早い染色体領域に局在した。もう一つは、S 期の後半から G2 期にかけて増加する Smc3ac であり、これは複製タイミングの遅い染色体領域に結合していた。また、G2 期の染色体において、複製タイミングの早い領域では遅い領域よりも Sororin 結合量が少ないことが見出された。

染色体に結合する Smc3ac が一部失われていることは、コヒーシのアセチル化修飾、あるいは Smc3ac 自体の染色体結合が持続的でないことを示している。高等真核生物では接着確立に Sororin が必要であり、Sororin のローディングは Smc3 アセチル化に依存することが知られている (Rankin *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2007)。コヒーシが染色体上に安定に結合するようになるには、Sororin の結合が Smc3 アセチル化反応と同時かその直後に時期的に近接して起こる必要があるのかもしれない。Sororin のローディングは DNA 複製に依存する (Rankin *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2007; Lafont *et al.*, 2010; Nishiyama *et al.*, 2010) ことを考えると、Esco1 と Esco2 によるアセチル化のうち、DNA 複製と共役する Esco2 依存のアセチル化が姉妹染色分体間の接着により繋がりやすいものと想像される。

本研究で使用した Sororin ChIP-seq 実験では Spike-in DNA を使用していないため、結合領域の正確な同定や、細胞周期の進行に伴う Sororin 結合量変化の定量的解析ができなかった。今後の課題は、Sororin を標的とした定量的 ChIP-seq 解析を行い Esco2 依存の Smc3 アセチル化との時期的な連携を正確に分析することであると考えている。

#### 4.7 染色体上の Smc3ac 結合が減少することの生理学的意義

G2 期までに染色体上から失われる Smc3ac 結合が相当量存在することは、DNA と安定的に結合し接着に寄与するコヒーシンは少量存在すれば十分であることを示しているのかもしれない。あるいは、細胞は染色体と容易に結合・解離できる動的なコヒーシンを十分に確保する必要があるのかもしれない。

染色体の高次構造を形作ったり、遺伝子の発現を制御したりといった機能は、タイムリーに調節される必要がある。したがって、こうした接着以外の機能を担うコヒーシンは動的に結合できるコヒーシだろうと推察される。長い染色体 DNA をもつ高等真核生物においては特に、染色体構造の組織化と転写制御を担う動的なコヒーシが細胞内に多く必要なのかもしれない。もしそうであれば、本研究で観察された Smc3ac の減少は、接着とそれ以外の機能に関与するコヒーシンの量を適切に調節する重要な機構といえる。Smc3ac 減少の生理学的意義の解明が今後の課題である。併せて、染色体上の Smc3ac を減少させる因子の特定も興味深い課題であると考えている。

## 5. 参考文献

- Bailey, T., P. Krajewski, I. Ladunga, C. Lefebvre, Q. Li, T. Liu, P. Madrigal, C. Taslim, and J. Zhang. 2013. "Practical Guidelines for the Comprehensive Analysis of ChIP-Seq Data." *PLoS Computational Biology* 9 (11): e1003326.
- Chen, K., Z. Hu, Z. Xia, D. Zhao, W. Li, and J. K. Tyler. 2015. "The Overlooked Fact: Fundamental Need for Spike-in Control for Virtually all Genome-Wide Analyses." *Molecular and Cellular Biology* 36 (5): 662-667.
- Davidson, I. F., D. Goetz, M. P. Zaczek, M. I. Molodtsov, Huis In 't Veld, P J, F. Weissmann, G. Litos, et al. 2016. "Rapid Movement and Transcriptional Re-Localization of Human Cohesin on DNA." *The EMBO Journal* 35 (24): 2671-2685.
- Deardorff, M. A., M. Bando, R. Nakato, E. Watrin, T. Itoh, M. Minamino, K. Saitoh, et al. 2012. "HDAC8 Mutations in Cornelia De Lange Syndrome Affect the Cohesin Acetylation Cycle." *Nature* 489 (7415): 313-317.
- Errico, A., C. Cosentino, T. Rivera, A. Losada, E. Schwob, T. Hunt, and V. Costanzo. 2009. "Tipin/Tim1/And1 Protein Complex Promotes Pol Alpha Chromatin Binding and Sister Chromatid Cohesion." *The EMBO Journal* 28 (23): 3681-3692.
- Farina, A., J. H. Shin, D. H. Kim, V. P. Bermudez, Z. Kelman, Y. S. Seo, and J. Hurwitz. 2008. "Studies with the Human Cohesin Establishment Factor, ChIR1. Association of ChIR1 with Ctf18-RFC and Fen1." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (30): 20925-20936.

- Gandhi, R., P. J. Gillespie, and T. Hirano. 2006. "Human Wapl is a Cohesin-Binding Protein that Promotes Sister-Chromatid Resolution in Mitotic Prophase." *Current Biology : CB* 16 (24): 2406-2417.
- Gerlich, D., B. Koch, F. Dupeux, J. M. Peters, and J. Ellenberg. 2006. "Live-Cell Imaging Reveals a Stable Cohesin-Chromatin Interaction After but Not before DNA Replication." *Current Biology : CB* 16 (15): 1571-1578.
- Guacci, V., D. Koshland, and A. Strunnikov. 1997. "A Direct Link between Sister Chromatid Cohesion and Chromosome Condensation Revealed through the Analysis of MCD1 in *S. Cerevisiae*." *Cell* 91 (1): 47-57.
- Haering, C. H., A. M. Farcas, P. Arumugam, J. Metson, and K. Nasmyth. 2008. "The Cohesin Ring Concatenates Sister DNA Molecules." *Nature* 454 (7202): 297-301.
- Hanna, J. S., E. S. Kroll, V. Lundblad, and F. A. Spencer. 2001. "Saccharomyces Cerevisiae CTF18 and CTF4 are Required for Sister Chromatid Cohesion." *Molecular and Cellular Biology* 21 (9): 3144-3158.
- Harmanci, A., J. Rozowsky, and M. Gerstein. 2014. "MUSIC: Identification of Enriched Regions in ChIP-Seq Experiments using a Mappability-Corrected Multiscale Signal Processing Framework." *Genome Biology* 15 (10): 474-3.
- Higashi, T. L., M. Ikeda, H. Tanaka, T. Nakagawa, M. Bando, K. Shirahige, Y. Kubota, H. Takisawa, H. Masukata, and T. S. Takahashi. 2012. "The Prereplication Complex Recruits XEco2 to Chromatin to Promote Cohesin Acetylation in *Xenopus* Egg Extracts." *Current Biology : CB* 22 (11): 977-988.

- Hou, F. and H. Zou. 2005. "Two Human Orthologues of Eco1/Ctf7 Acetyltransferases are both Required for Proper Sister-Chromatid Cohesion." *Molecular Biology of the Cell* 16 (8): 3908-3918.
- Hu, B., N. Petela, A. Kurze, K. L. Chan, C. Chapard, and K. Nasmyth. 2015. "Biological Chromodynamics: A General Method for Measuring Protein Occupancy Across the Genome by Calibrating ChIP-Seq." *Nucleic Acids Research* 43 (20): e132.
- Ivanov, D. and K. Nasmyth. 2005. "A Topological Interaction between Cohesin Rings and a Circular Minichromosome." *Cell* 122 (6): 849-860.
- Ivanov, D., A. Schleiffer, F. Eisenhaber, K. Mechtler, C. H. Haering, and K. Nasmyth. 2002. "Eco1 is a Novel Acetyltransferase that can Acetylate Proteins Involved in Cohesion." *Current Biology : CB* 12 (4): 323-328.
- Ivanov, M. P., R. Ladurner, I. Poser, R. Beveridge, E. Rampler, O. Hudecz, M. Novatchkova, et al. 2018. "The Replicative Helicase MCM Recruits Cohesin Acetyltransferase ESCO2 to Mediate Centromeric Sister Chromatid Cohesion." *The EMBO Journal* 37 (15): 10.15252/embj.201797150. Epub 2018 Jun 21.
- Kagey, M. H., J. J. Newman, S. Bilodeau, Y. Zhan, D. A. Orlando, N. L. van Berkum, C. C. Ebmeier, et al. 2010. "Mediator and Cohesin Connect Gene Expression and Chromatin Architecture." *Nature* 467 (7314): 430-435.

- Kanke, M., E. Tahara, Huis In't Veld, P J, and T. Nishiyama. 2016. "Cohesin Acetylation and Wapl-Pds5 Oppositely Regulate Translocation of Cohesin Along DNA." *The EMBO Journal* 35 (24): 2686-2698.
- Kueng, S., B. Hegemann, B. H. Peters, J. J. Lipp, A. Schleiffer, K. Mechtler, and J. M. Peters. 2006. "Wapl Controls the Dynamic Association of Cohesin with Chromatin." *Cell* 127 (5): 955-967.
- Ladurner, R., E. Kreidl, M. P. Ivanov, H. Ekker, M. H. Idarraga-Amado, G. A. Busslinger, G. Wutz, D. A. Cisneros, and J. M. Peters. 2016. "Sororin Actively Maintains Sister Chromatid Cohesion." *The EMBO Journal* 35 (6): 635-653.
- Lafont, A. L., J. Song, and S. Rankin. 2010. "Sororin Cooperates with the Acetyltransferase Eco2 to Ensure DNA Replication-Dependent Sister Chromatid Cohesion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (47): 20364-20369.
- Landt, S. G., G. K. Marinov, A. Kundaje, P. Kheradpour, F. Pauli, S. Batzoglou, B. E. Bernstein, et al. 2012. "ChIP-Seq Guidelines and Practices of the ENCODE and modENCODE Consortia." *Genome Research* 22 (9): 1813-1831.
- Langmead, B. and S. L. Salzberg. 2012. "Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2." *Nature Methods* 9 (4): 357-359.
- Lengronne, A., Y. Katou, S. Mori, S. Yokobayashi, G. P. Kelly, T. Itoh, Y. Watanabe, K. Shirahige, and F. Uhlmann. 2004. "Cohesin Relocation from Sites of Chromosomal Loading to Places of Convergent Transcription." *Nature* 430 (6999): 573-578.



- Lengronne, A., J. McIntyre, Y. Katou, Y. Kanoh, K. P. Hopfner, K. Shirahige, and F. Uhlmann. 2006. "Establishment of Sister Chromatid Cohesion at the S. Cerevisiae Replication Fork." *Molecular Cell* 23 (6): 787-799.
- Losada, A., M. Hirano, and T. Hirano. 1998. "Identification of Xenopus SMC Protein Complexes Required for Sister Chromatid Cohesion." *Genes & Development* 12 (13): 1986-1997.
- Maserati, E., F. Pasquali, O. Zuffardi, P. Buttitta, C. Cuoco, G. Defant, G. Gimelli, and M. Fraccaro. 1991. "Roberts Syndrome: Phenotypic Variation, Cytogenetic Definition and Heterozygote Detection." *Annales De Genetique* 34 (3-4): 239-246.
- Mayer, M. L., S. P. Gygi, R. Aebersold, and P. Hieter. 2001. "Identification of RFC(Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): An Alternative RFC Complex Required for Sister Chromatid Cohesion in S. Cerevisiae." *Molecular Cell* 7 (5): 959-970.
- Michaelis, C., R. Ciosk, and K. Nasmyth. 1997. "Cohesins: Chromosomal Proteins that Prevent Premature Separation of Sister Chromatids." *Cell* 91 (1): 35-45.
- Minamino, M., M. Ishibashi, R. Nakato, K. Akiyama, H. Tanaka, Y. Kato, L. Negishi, et al. 2015. "Esco1 Acetylates Cohesin Via a Mechanism Different from that of Esco2." *Current Biology : CB* 25 (13): 1694-1706.
- Minamino, M., S. Tei, L. Negishi, M. T. Kanemaki, A. Yoshimura, T. Sutani, M. Bando, and K. Shirahige. 2018. "Temporal Regulation of ESCO2 Degradation by the MCM Complex, the CUL4-DDB1-VPRBP Complex, and the Anaphase-Promoting Complex." *Current Biology : CB* 28 (16): 2665-2672.e5.

- Moldovan, G. L., B. Pfander, and S. Jentsch. 2006. "PCNA Controls Establishment of Sister Chromatid Cohesion during S Phase." *Molecular Cell* 23 (5): 723-732.
- Nakato, R., T. Itoh, and K. Shirahige. 2013. "DROMPA: Easy-to-Handle Peak Calling and Visualization Software for the Computational Analysis and Validation of ChIP-Seq Data." *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 18 (7): 589-601.
- Nasmyth, K. and C. H. Haering. 2009. "Cohesin: Its Roles and Mechanisms." *Annual Review of Genetics* 43: 525-558.
- Nishiyama, T., R. Ladurner, J. Schmitz, E. Kreidl, A. Schleiffer, V. Bhaskara, M. Bando, et al. 2010. "Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl." *Cell* 143 (5): 737-749.
- Parelho, V., S. Hadjur, M. Spivakov, M. Leleu, S. Sauer, H. C. Gregson, A. Jarmuz, et al. 2008. "Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms." *Cell* 132 (3): 422-433.
- Prasanth, S. G., J. Mendez, K. V. Prasanth, and B. Stillman. 2004. "Dynamics of Pre-Replication Complex Proteins during the Cell Division Cycle." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 359 (1441): 7-16.
- Rahman, S., M. J. Jones, and P. V. Jallepalli. 2015. "Cohesin Recruits the Esco1 Acetyltransferase Genome Wide to Repress Transcription and Promote Cohesion in Somatic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (36): 11270-11275.

- Rankin, S., N. G. Ayad, and M. W. Kirschner. 2005. "Sororin, a Substrate of the Anaphase-Promoting Complex, is Required for Sister Chromatid Cohesion in Vertebrates." *Molecular Cell* 18 (2): 185-200.
- Rankin, Susannah and Dean S. Dawson. 2016. "Recent Advances in Cohesin Biology." *F1000Research* 5: 1909.
- Rolef Ben-Shahar, T., S. Heeger, C. Lehane, P. East, H. Flynn, M. Skehel, and F. Uhlmann. 2008. "Eco1-Dependent Cohesin Acetylation during Establishment of Sister Chromatid Cohesion." *Science (New York, N.Y.)* 321 (5888): 563-566.
- Rowland, B. D., M. B. Roig, T. Nishino, A. Kurze, P. Uluocak, A. Mishra, F. Beckouet, et al. 2009. "Building Sister Chromatid Cohesion: Smc3 Acetylation Counteracts an Antiestablishment Activity." *Molecular Cell* 33 (6): 763-774.
- Sakuno, T. and Y. Watanabe. 2009. "Studies of Meiosis Disclose Distinct Roles of Cohesion in the Core Centromere and Pericentromeric Regions." *Chromosome Research : An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 17 (2): 239-249.
- Schmitz, J., E. Watrin, P. Lenart, K. Mechtler, and J. M. Peters. 2007. "Sororin is Required for Stable Binding of Cohesin to Chromatin and for Sister Chromatid Cohesion in Interphase." *Current Biology : CB* 17 (7): 630-636.
- Skibbens, R. V. 2004. "Chl1p, a DNA Helicase-Like Protein in Budding Yeast, Functions in Sister-Chromatid Cohesion." *Genetics* 166 (1): 33-42.

- Skibbens, R. V., L. B. Corson, D. Koshland, and P. Hieter. 1999. "Ctf7p is Essential for Sister Chromatid Cohesion and Links Mitotic Chromosome Structure to the DNA Replication Machinery." *Genes & Development* 13 (3): 307-319.
- Stigler, J., G. O. Camdere, D. E. Koshland, and E. C. Greene. 2016. "Single-Molecule Imaging Reveals a Collapsed Conformational State for DNA-Bound Cohesin." *Cell Reports* 15 (5): 988-998.
- Sutani, T., T. Kawaguchi, R. Kanno, T. Itoh, and K. Shirahige. 2009. "Budding Yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 Complex Counteracts Sister Chromatid Cohesion-Establishing Reaction." *Current Biology : CB* 19 (6): 492-497.
- Tanaka, H., Y. Kubota, T. Tsujimura, M. Kumano, H. Masai, and H. Takisawa. 2009. "Replisome Progression Complex Links DNA Replication to Sister Chromatid Cohesion in *Xenopus* Egg Extracts." *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 14 (8): 949-963.
- Toth, A., R. Ciosk, F. Uhlmann, M. Galova, A. Schleiffer, and K. Nasmyth. 1999. "Yeast Cohesin Complex Requires a Conserved Protein, Eco1p(Ctf7), to Establish Cohesion between Sister Chromatids during DNA Replication." *Genes & Development* 13 (3): 320-333.
- Uhlmann, F. 2016. "SMC Complexes: From DNA to Chromosomes." *Nature Reviews.Molecular Cell Biology* 17 (7): 399-412.
- Unal, E., J. M. Heidinger-Pauli, W. Kim, V. Guacci, I. Onn, S. P. Gygi, and D. E. Koshland. 2008. "A Molecular Determinant for the Establishment of Sister Chromatid Cohesion." *Science (New York, N.Y.)* 321 (5888): 566-569.

- Van Den Berg, D J and U. Francke. 1993. "Roberts Syndrome: A Review of 100 Cases and a New Rating System for Severity." *American Journal of Medical Genetics* 47 (7): 1104-1123.
- Vega, H., Q. Waisfisz, M. Gordillo, N. Sakai, I. Yanagihara, M. Yamada, D. van Gosliga, et al. 2005. "Roberts Syndrome is Caused by Mutations in ESCO2, a Human Homolog of Yeast ECO1 that is Essential for the Establishment of Sister Chromatid Cohesion." *Nature Genetics* 37 (5): 468-470.
- Waizenegger, I., J. F. Gimenez-Abian, D. Wernic, and J. M. Peters. 2002. "Regulation of Human Separase by Securin Binding and Autocleavage." *Current Biology : CB* 12 (16): 1368-1378.
- Warren, C. D., D. M. Eckley, M. S. Lee, J. S. Hanna, A. Hughes, B. Peyser, C. Jie, R. Irizarry, and F. A. Spencer. 2004. "S-Phase Checkpoint Genes Safeguard High-Fidelity Sister Chromatid Cohesion." *Molecular Biology of the Cell* 15 (4): 1724-1735.
- Wendt, K. S., K. Yoshida, T. Itoh, M. Bando, B. Koch, E. Schirghuber, S. Tsutsumi, et al. 2008. "Cohesin Mediates Transcriptional Insulation by CCCTC-Binding Factor." *Nature* 451 (7180): 796-801.
- Whelan, G., E. Kreidl, G. Wutz, A. Egner, J. M. Peters, and G. Eichele. 2012. "Cohesin Acetyltransferase Esco2 is a Cell Viability Factor and is Required for Cohesion in Pericentric Heterochromatin." *The EMBO Journal* 31 (1): 71-82.

- Xu, H., C. Boone, and H. L. Klein. 2004. "Mrc1 is Required for Sister Chromatid Cohesion to Aid in Recombination Repair of Spontaneous Damage." *Molecular and Cellular Biology* 24 (16): 7082-7090.
- Yan, J., M. Enge, T. Whittington, K. Dave, J. Liu, I. Sur, B. Schmierer, et al. 2013. "Transcription Factor Binding in Human Cells Occurs in Dense Clusters Formed Around Cohesin Anchor Sites." *Cell* 154 (4): 801-813.
- Zhang, J., X. Shi, Y. Li, B. J. Kim, J. Jia, Z. Huang, T. Yang, et al. 2008. "Acetylation of Smc3 by Eco1 is Required for S Phase Sister Chromatid Cohesion in both Human and Yeast." *Molecular Cell* 31 (1): 143-151.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学定量生命科学研究  
所、白髭克彦教授に深く感謝申し上げます。持病の治療と研究を両立できるよう、ウエ  
ットの実験データの取得に際し研究室内外の方々のご協力を取り付けて頂いたり、学外  
からのサーバー接続をご許可頂いたりなど、様々なご配慮を頂きました。研究の進捗を  
寛容に見守ってくださったことを改めて御礼申し上げます。

修士課程入学からの8年間に及ぶ長い間、厳しくも愛情をもって直接ご指導頂きまし  
た須谷尚史博士と中戸隆一郎博士に心より感謝申し上げます。須谷博士には、日頃の議  
論を通じて鋭い視点から考察の機会を与えて頂きました。また、本論文の作成に際して  
は文章や図表の度重なる校正を通じて全面的にご指導頂きました。中戸博士には情報処  
理の基礎的な知識と技術をご指導頂きました。

坂東優篤博士、吉村充騎博士、坂田豊典博士、田中博志博士には、研究を進めるにあ  
たり NGS サンプル取得や生物学的検証実験のために多くのお力添えを頂きました。  
Francis Click 研究所、南野雅博士には本研究のきっかけを与えて頂きました。中川恵  
子氏、横田直子氏には、NGS データの処理においてご協力頂きました。白髭研究室の  
皆様には、日常的に貴重なご助言と励ましを頂きました。厚く御礼申し上げます

最後に、大学入学から博士課程修了まで温かく根気強く私を支えてくれた両親と夫に  
心からの感謝の意を表して謝辞と致します。

令和元年 12 月 13 日

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用生命工学専攻 博士課程

石橋 舞