

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。

