

博士論文

コヒーシニアセチルトランスフェラーゼによる
姉妹染色分体間接着の構築機構の解析

東京大学大学院

農学生命科学研究科 応用生命工学専攻

南野 雅

指導教官 白髭克彦 教授

目次

1. 要旨

2. 略語一覧

3. 序論

4. 材料と方法

5. 結果

6. 考察

7. 参考論文

8. 謝辞

1. 要旨

背景

細胞が遺伝情報を正確に継承するためには、染色体を正確に複製・分配する必要がある。SMC1、SMC3、Rad21、SA1 または SA2 の 4 つのサブユニットから構成されるコヒーシンは、リング状の構造を利用して、複製された姉妹染色分体を分配するまでの間、束ねておく。コヒーシンは、分裂期終期から染色体上に存在し、S 期に姉妹染色分体間接着を形成した後、分裂期になると、セパレーズ、Aurora B キナーゼ等によって、染色体から取り除かれる。近年の研究から、姉妹染色分体間接着の形成には、コヒーシンサブユニット SMC3 がアセチル化されることが必要であることが報告されている。この SMC3 のアセチル化を通じた姉妹染色分体間接着の形成は酵母からヒトまで保存されており、ヒトでは、Esco1、Esco2 によって、SMC3 の 105 番目、106 番目のリシンがアセチル化される。これら 2 アセチル化酵素は、細胞周期において、異なる制御を受けており、Esco1 は細胞周期を通じて発現する一方で、Esco2 は S 期のみ発現することが知られているが、実際にこれら 2 種類のアセチル化酵素がどのように SMC3 をアセチル化しているか、詳細な制御機構は不明である。また、近年になって、酵母、マウス細胞において、コヒーシン相互作用タンパク質 Pds5 が SMC3 のアセチル化に必要であることが報告されたものの、この Pds5 の性質はヒト細胞まで保存されているのか、また保存されているならば、Pds5 がどのように SMC3 アセチル化を制御しているのか、明らかにされていない。そこで、本研究では、Esco1 と Esco2 がその他コヒーシン制御因子とどのように連携し、SMC3 をアセチル化するかを明らかにする目的とした。

細胞周期における Esco1、Esco2 の機能的差異

Esco1、Esco2 を siRNA によりノックダウンした上で、細胞を S 期に同調し、SMC3

アセチル化を解析したところ、Esco1、Esco2 単独のノックダウンではアセチル化レベルはほぼ変化せず、両者のノックダウンにより、大幅に減少することがわかった。一方、G1 期においては、Esco2 ノックダウンで SMC3 アセチル化レベルは変化せず、Esco1 のノックダウンで著しく減少した。以上の結果は、S 期の SMC3 アセチル化は Esco1、Esco2 が担っており、G1 期には Esco1 のみが機能していることを示している。また、G2 期において、Esco1 が SMC3 をアセチル化していることもわかった。これら結果は、細胞周期における Esco1、Esco2 の発現制御と一致しており、Esco1 は DNA 複製に依存せずに SMC3 をアセチル化できると考えられた。

Esco1 と Pds5 による SMC3 アセチル化制御

コヒーシン相互作用因子 Pds5 をノックダウンすると、ヒト細胞においても、SMC3 のアセチル化は減少した。SMC3 は、Esco1、Esco2 の両者にアセチル化されることから、Pds5、Esco1、Esco2 の関連を解析した。その結果、Pds5 ノックダウンと Esco1 ノックダウンを組み合わせても、SMC3 のアセチル化に加算的な減少は見られなかったが、Esco2 ノックダウンと組み合わせることにより、アセチル化量は大幅に減少することを見出した。これら細胞の姉妹染色分体間接着の形成率を調べたところ、SMC3 アセチル化の減少に伴って、姉妹染色分体間の接着が欠損する細胞の割合が増加した。これら結果は、Esco1 と Pds5 が協調して機能していることを示している。興味深いことに、Esco タンパク質と Pds5 の物理的な相互作用を検証した結果、Pds5 は Esco1 と選択的に相互作用することが判明した。そして、Esco1 の断片を作製し、Pds5 との相互作用の有無を調べると、Esco1 は中間領域を介して、Pds5 と結合していることがわかった。さらにこの領域内の 3 アミノ酸をアラニンに置換することで、Pds5 との結合が減少した。この Esco1 変異体を、ヒト細胞において内在 Esco1 と置換したところ、SMC3 アセチル化が減少し、また姉妹染色分体間の接着も欠損した。以上の結果から、Esco1 と

Pds5 の結合が Escol1 の機能に必須であると考えている。

Escol1 の染色体上での局在を ChIP-sequencing により網羅的に解析したところ、G1、G2 期において、Escol1 はコヒーシンと共局在していることが判明した。また、ChIP-qPCR によって、S 期進行過程における Escol1 の局在を解析したところ、S 期を通じて、ほぼ一定量の Escol1 がコヒーシン部位に局在していた。これら結果から、Escol1 は間期を通じてコヒーシンと共局在していると考えられる。また、Pds5 をノックダウンすると、この Escol1 の局在はゲノムワイドに減少し、さらに、Pds5 との相互作用を減少させる変異を Escol1 に導入することにより、局在が著しく減少することも見出している。これら結果から、Pds5 は Escol1 をコヒーシン上に局在させることで、SMC3 アセチル化を促進していると考えられた。

Escol1 は分裂期になるとリン酸化修飾を受けることが知られる。リン酸化部位を質量解析により分析したところ、Escol1 は、Pds5 相互作用ドメイン内にリン酸化修飾を受けることがわかった。そして、当リン酸化修飾を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、当リン酸化修飾を仲介する分裂期キナーゼの探索を行ったところ、Aurora B キナーゼの阻害剤を分裂期細胞に処理することで、Escol1 のリン酸化修飾が消失することを見出した。また、興味深いことに、当該アミノ酸部位にリン酸化様変異を導入すると、Pds5 との相互作用が減少した。これら結果から、Aurora B は、分裂期になると Escol1 をリン酸化し、Pds5 との相互作用を弱めていると考えられた。この相互作用は Escol1 のコヒーシン部位への局在、さらには SMC3 アセチル化に必須であることから、Aurora B は分裂期に Escol1 の機能を弱めている可能性がある。

Escol2 と MCM 複合体による SMC3 アセチル化制御

Escol1 は Pds5 に制御される一方で、Pds5 をノックダウンしても、Escol2 の機能は影響されなかったことから、Escol2 は Escol1 と異なる経路で機能していることが考えら

れた。そこで、Esco2の相互作用因子を探索したところ、複製開始前複合体の構成タンパク質であるMCM複合体と相互作用することがわかった。一方で、Esco1とMCM複合体の相互作用は検出されなかった。Esco2とMCM複合体の相互作用は、Esco2のN末端領域にアラニン変異を導入することで阻害されたことから、Esco2はN末端を介して、MCM複合体と結合していると考えられる。また、HeLa細胞において、siRNAを用いて、MCM6、MCM7をノックダウンしたところ、Esco1によるSMC3アセチル化には影響が見られなかった一方で、Esco2によるSMC3アセチル化は大幅に減少した。この結果から、MCM複合体はEsco2の機能に必須であると考えている。さらに、Esco2の動態を解析したところ、MCMノックダウンによって、Esco2タンパク質が減少していることがわかった。この結果と関連して、MCM複合体と結合できないEsco2変異体はプロテアソーム依存的に分解されることも見出している。以上の結果から、MCM複合体はEsco2を安定化することでSMC3アセチル化を促進していると考えられた。

2. 略語一覽

SMC	Structural Maintenance of Chromosomes
Esco1/2	Establishment of Sister Chromatid Cohesion
SA	Stromal antigen
Pds5	Precocious Dissociation of Sisters
Wapl	Wings Apart-Like Homolog
MCM	Minichromosome maintenance
ORC	Origin recognition complex
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
CDK	Cyclin-dependent kinase
Plk	Polo-like kinase
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation

3. 序論

細胞が、正確に遺伝情報を継承するためには、S 期に染色体を正確に複製し、分裂期に倍加した染色体を娘細胞に均等分配する必要がある。コヒーシン複合体は、S 期に複製された姉妹染色分体を分裂中期まで束ねておく（コヒージョン形成）役割を担い、姉妹染色分体を正確に分配するために必須である(Guacci et al., 1997; Michaelis et al., 1997)。

コヒーシン複合体は、SMC ファミリータンパク質である SMC1 と SMC3 に加え、Rad21、SA1 または SA2 の 4 つのサブユニットから構成される。SMC ファミリータンパク質は N 末端側から head 領域、coiled-coil 領域、hinge 領域、coiled-coil 領域、head 領域から成り、hinge 領域で折れ曲がることで、N 末端領域と C 末端領域が協調的に作用し、head 構造をとる(モデル 1)。真核生物では、現在までに 6 種類の SMC タンパク質が報告され、コヒーシンを構成する SMC1、SMC3 以外に、SMC2、SMC4 は分裂期における染色体凝縮を司るコンデンシン複合体を構成し、SMC5、SMC6 は DNA ダメージ修復やチェックポイント応答に関わる複合体を構成している。コヒーシンは、SMC1 と SMC3 が hinge 領域を介してヘテロダイマーを形成し、それぞれの head 領域が kleisin スーパーファミリーに属する Rad21 と結合することにより、リング状の構造をとる。さらに、Rad21 の C 末端領域を介して SA1/2(SA1 または SA2)と結合し、コヒーシン複合体として機能する。その他にも、コヒーシンの相互作用タンパク質として、Pds5、Wapl、Sororin 等が知られており、これらのタンパク質によるコヒーシンの制御が姉妹染色分体間接着の形成とその解除に必要である(Nasmyth and Haering, 2009; Peters and Nishiyama, 2012)。

細胞周期におけるコヒーシンの動態をモデル 2 に示した。コヒーシンは、DNA 複製の開始前より染色体に結合している。しかしながら、コヒーシンが染色体へ結合するだ

けでは、姉妹染色分体間接着は形成されない。これは、コヒーシン除去因子の Wapl によって、コヒーシンがすみやかに染色体から取り除かれてしまうためである。Wapl によるコヒーシン阻害活性に拮抗するために、コヒーシンサブユニットの SMC3 がアセチル化されることによって、コヒーシンが安定的に染色体に結合する必要がある（姉妹染色分体間接着の確立; Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Rowland et al., 2009; Unal et al., 2008; Zhang et al., 2008）。高等真核生物においては、SMC3 がアセチル化されることで Sororin がコヒーシンに結合し、その Sororin が Wapl によるコヒーシン除去を分裂期まで抑えておくと考えられている (Nishiyama et al., 2010)。

コヒーシンは S 期に姉妹染色分体間の接着が確立された後、分裂期に染色体から 2 段階の経路で除去される。まず、サイクリン依存性キナーゼ 1 (Cdk1)、Polo 様キナーゼ 1(Plk1)、Aurora B キナーゼによって、染色体腕部のコヒーシンが染色体から除去される(Giménez-Abián et al., 2004; Lénárt et al., 2007; Sumara et al., 2000)。Cdk1、Aurora B キナーゼは、Sororin をリン酸化し、Sororin を不活性化することが知られる (Nishiyama et al., 2013)。その結果、Wapl がコヒーシン除去活性を獲得し、コヒーシンを染色体から除去する。その後、分裂期中期から分裂期後期への移行に伴って、活性化したセパレーズがコヒーシンサブユニットの Rad21 を切断することで、染色体に結合している残りのコヒーシンが染色体により取り除かれ、染色体分配が完了する。

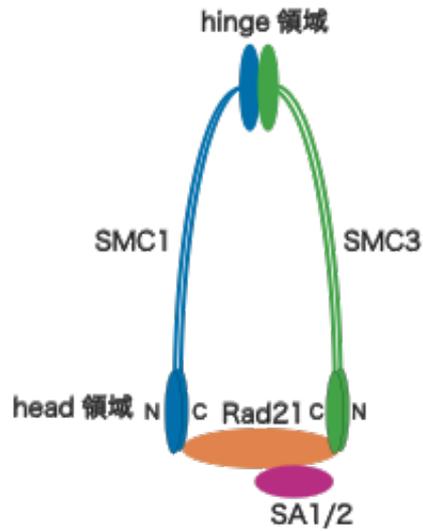
SMC3 は、酵母においては 112 番目のリシン(K112)と 113 番目のリシン(K113)が、ヒトにおいては 105 番目のリシン(K105)と 106 番目のリシン(K106)がアセチル化され、SMC3 のアセチル化を通じた姉妹染色分体間接着の確立は、出芽酵母からヒトまで保存されている (Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Rowland et al., 2009; Unal et al., 2008; Zhang et al., 2008)。現在までに、SMC3 アセチル化に関する研究は出芽酵母を用いて盛んに行われており、そのアセチル化酵素として Eco1 アセチルトランスフェラーゼが同定されている(Rolef Ben-Shahar et al., 2008; Rowland et al., 2009; Unal et al.,

2008) Eco1 は、C 末端領域にアセチルトランスフェラーゼドメインの他に、DNA 複製の際に DNA ポリメラーゼの足場となる PCNA タンパク質との相互作用ドメインを持つ (Moldovan et al., 2006)。実際に Eco1 と PCNA の物理的な相互作用も観察されており、その結合は Eco1 のクロマチン結合、さらにはコヒージョン形成に必須である (Moldovan et al., 2006)。これらの結果から、Eco1 は、PCNA と相互作用することにより DNA 複製装置と一緒に S 期染色体上を移動し、複製された染色体と鋳型の染色体間の接着を確立させていると想定されているが、その移動は実際には捉えられていない。

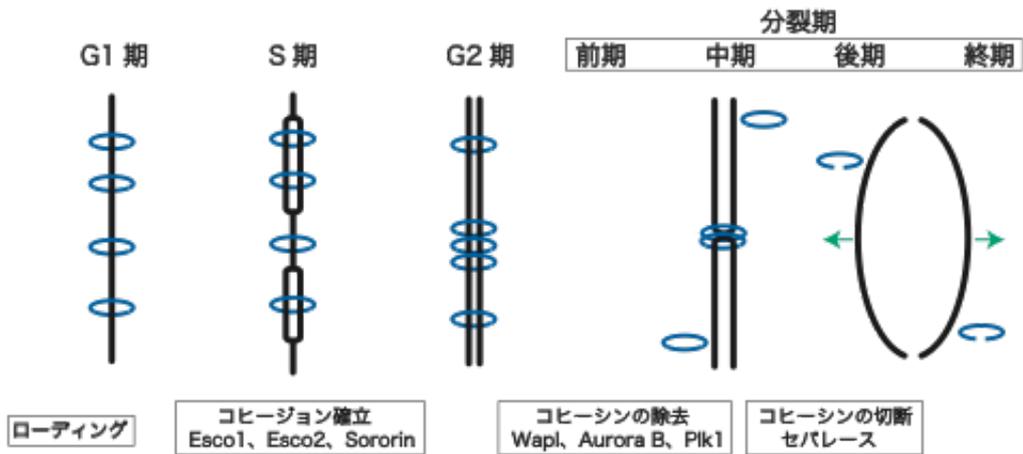
酵母では、一つのコヒーシンアセチル化酵素 Eco1 が存在する一方、脊椎動物では、2 つの Eco1 ホモログ (ヒトでは Esco1、Esco2、アフリカツメガエルでは XEco1、XEco2) が存在する (Hou and Zou, 2005)。モデル 3 に、Esco1、Esco2、Eco1 の構造を模式的に示した。Esco1/XEco1、Esco2/XEco2 の N 末端領域から中央領域にかけては、脊椎動物のコヒーシンアセチルトランスフェラーゼ特有に見られるものであり、C 末端領域は、出芽酵母 Eco1 と同様、アセチルトランスフェラーゼドメインと PCNA 相互作用ドメインを持つ (Hou and Zou, 2005)。興味深いことに、ヒト細胞においては、SMC3 は PCNA が染色体に結合するまえから既にアセチル化されており、Esco1、Esco2 のクロマチン結合は、PCNA 相互作用ドメインでなく、N 末端領域を介して行われる (Hou and Zou, 2005; Song et al., 2012)。また、アフリカツメガエルの卵抽出液を用いた解析においても、SMC3 のアセチル化は、PCNA には依存しないことが知られる (Higashi et al., 2012)。これら結果から、脊椎動物においては、PCNA 以外の因子によって、コヒーシンアセチルトランスフェラーゼが制御されていると考えられる。

ヒト細胞において、Esco1、Esco2 は細胞周期で異なる制御を受ける。Esco1 は細胞周期を通じて発現しており、分裂期になるとリン酸化修飾を受ける (Hou and Zou, 2005)。その一方で、Esco2 は S 期に発現し、それ以降は急速に分解される (Hou and Zou, 2005)。ヒト Esco1、Esco2 は、両者ともに SMC3 をアセチル化するが、その機能は完

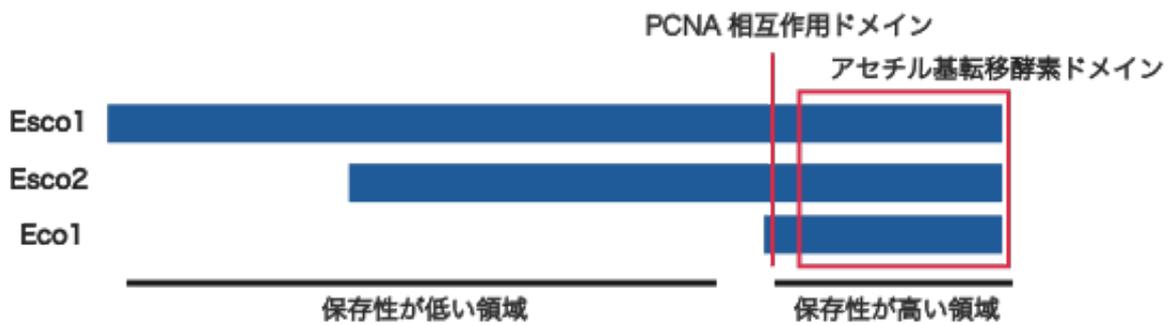
全には重複せず、両者ともに姉妹染色分体間接着に必要である(Hou and Zou, 2005; Nishiyama et al., 2010)。しかしながら、これら Esco1、Esco2 にどのような違いがあるのか、また、これら 2 酵素がどのように SMC3 アセチル化を制御しているのか、詳細は不明である。そこで、本研究では、Esco1、または Esco2 による SMC3 アセチル化を通じた姉妹染色分体間接着形成機構について、それぞれの特異性を明らかにすることを目的とした。



モデル1 コヒーシン複合体の構造



モデル2 細胞周期に於けるコヒーシンの動態



モデル3 ヒト Esco1、Esco2、出芽酵母 Eco1 の構造

3. 材料と方法

(1) 細胞の培養とバキュロウイルスの作製

HeLa 細胞（ヒト子宮頸ガン細胞）は FALCON 社のプラスチックディッシュ上で 37°C CO₂ 濃度 5%の条件で培養した。培養液として、GIBCO 社の Dullbecco modified Eagle medium に 10%FBS(ウシ胎児血清)を添加したのものを使った。Sf9 昆虫細胞は、Grace's Insect Medium（GIBCO 社）に、10%FBS を添加して、37°Cで培養した。バキュロウイルスの作製には、Invitrogen 社の Bac-to-Bac Baculovirus Expression System を使用した。

(2) 細胞周期の同調法

ダブルチミジン処理により細胞を S 期初期に同調した。HeLa 細胞を 2mM チミジン存在下で 24 時間培養した後、PBS で 2 度洗浄し、チミジンを含まない培地に交換した(リリースした)。10 時間後、再びチミジンを添加し、さらに 14 時間培養することで、S 期初期に停止させた。そして、チミジンを含まない培地に交換し、各々の時間に細胞を回収した。細胞を分裂期中期に停止させる場合は、リリース 6 時間後に微小管重合阻害剤ノコダゾールを終濃度 100ng/ml になるように添加し、さらに 4 時間培養した。Aurora キナーゼを阻害する場合には、ノコダゾールと同時に ZM447439 を終濃度 2 μM、もしくは 5 μM になるように添加した。

(3)クロマチン分画法によるタンパク質抽出液の調製

PBS で洗浄してディッシュ上の培地を除去した後、トリプシンを用いて細胞を回収した。細胞を PBS で 2 回洗浄した上で、クロマチン分画バッファー(組成は下に記した)に懸濁し、10 分間、氷上で静置した。その後、4000r.p.m.で 5 分間遠心し、上清を可

溶化画分とした。沈殿は、クロマチン分画バッファーにもう一度懸濁し、遠心した。その後、上清を取り除いて、再度クロマチン分画バッファーに懸濁したものをクロマチン画分とした。

クロマチン分画バッファーの組成

20mM HEPES(pH 7.4)

10mM KCl

100mM NaCl

1.5mM MgCl₂

0.34M Sucrose

10% Glycerol

10mM NaF

10mM β -Glycerophosphate

10mM Sodium Butyrate

1×complete protease inhibitor (Roche)

(4)ウエスタンブロッティング解析

SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写し、5%スキムミルクを含む PBS-T(1×PBS、0.5% Tween-20)で一時間、ブロッキングした。その後、Max Blot で 1000 倍に希釈した抗体溶液で 1 時間処理した。そして、PBS-T で 1 時間洗浄し、5%ミルクを含む PBS-T で 2000 倍に希釈した HRP 融合抗マウス抗体、抗うさぎ抗体で 1 時間処理した。最後に 1 時間洗浄した後、Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore 社)により検出した。

(5) 抗体

本研究に用いた抗体の出典を下に示す。

抗体	出典
Sororin	オーストリア分子病理学研究所 Jan-Michael Peters 博士より供与
Rad21 (for ChIP)	財団法人癌研究会 広田亨博士より供与
Rad21 (for westernblotting)	Millipore
Esco1	当研究室にて作製
Esco2	当研究室にて作製、または abcam
Esco1 S302 phosphorylation	当研究室にて作製
Pds5A	当研究室にて作製
Pds5B	当研究室にて作製
SMC3-ac	当研究室にて作製
SMC3	abcam
SMC1	abcam
Tubulin	Sigma
Histone H3	abcam
Histone H3S10 phosphorylation	Cell Signaling Technology
FLAG	Sigma
Myc	Millipore
His	MBL
Wapl	ProteinTech Group
GFP (for immunoprecipitation)	Invitrogen

GFP (for ChIP)	Torrey Pines Biolabs
MCM2	Cell Signaling Technology
MCM6	Santacruz
MCM7	Cell Signaling Technology
Orc2	MBL
PCNA	Santacruz

(5)FACS 解析

回収した細胞を PBS で 2 度洗浄し、再度 PBS に懸濁した。そして、終濃度 70%になるようにエタノールを加え、固定した。PBS で再度洗浄した後、RNase を用いて RNA を切断し、最後に PI 溶液に懸濁した。そして、Becton-Dickinson Facscan(BD)を使用して、1 細胞あたりの DNA 含有量を測定した。

染色液の組成

0.05 ug/ uL Propidium iodide

0.1 mg/ mL RNase (Roche)

1×PBS

(6)ギムザ染色による分裂期染色体形態の解析

ディッシュに少量の培地を入れた状態で強く叩き、接着が弱くなった分裂期の細胞のみを回収した。遠心によって回収した細胞を 500 μ l の PBS に懸濁し、500 μ l の室温の水道水を入れた。5 分後、カルノア液(1:3 の割合で調整した酢酸メタノール)を 400 μ l

入れ、遠心して染色体を回収した。カルノア液で3回洗浄した後、染色体をスライドガラス上で乾燥させ、5%ギムザ染色液で5分間染色した。その後、スライドガラスを蒸留水で洗浄し、顕微鏡で分裂期染色体を観察した。

(7)RNAi 処理

invirtogen 社の Lipofectamine RNAiMAX を用い、kit 付属のプロトコールに従って行った。

使用した siRNA のセンス・アンチセンス配列を以下に示した。

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

Esco2 #1 siRNA (5'-UUUAGGAACAACUUGCUGGAAGCCC-3'),

Esco2 #2 siRNA (5'-AUAACUUGCCAUCUGGUGUUGGGUC-3'),

Esco2 #3 siRNA (5'-AUACUUAGCAGUUAACUCUUCUGU-3'),

Pds5A siRNA (5'-UAUUGUUGAUCACUGAGAAGAGAGU-3'

または 5'-AACAGUUAGCCUCUGAUGUAGGCUG-3'),

Pds5B siRNA (5'-UUAUAAGAGCACUGAUAGAUUCGG-3'),

sororin siRNA (5'-AACUCCCGAGCAUCCUCCUGAAAU-3'),

Rad21 siRNA (5'-UUCCACUCUACUCUGAUUCAAGCUG-3').

(8) 免疫沈降法

細胞を PBS で洗浄後、免疫沈降バッファーに懸濁し、10分間、氷上で静置した。そし

て、15000r.p.m.で30分間遠心し、上清を回収した（一部はinput画分として回収しておく）。上清に、ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA)を30 μ l分加え、2時間、4℃で反応させた後、免疫沈降バッファーでゲルビーズを3度洗浄した。

免疫沈降バッファーの組成

25mM Tris (pH 7.5)

150mM NaCl

10% Glycerol

0.2% NP-40

1×complete protease inhibitor (Roche)

(9) クロマチン免疫沈降法

HeLa細胞を1%のホルムアルデヒドを含む培地で10分間、室温で処理した。そして、PBSで細胞を2度洗浄し、スクレイパーで回収した。その後、液体窒素で急速に凍結させ、一度、-80℃で保存した。LB1、LB2、LB3バッファーと続いて細胞を処理し、ソニケーターで細胞を破砕した後、15000r.p.mで10分間遠心した。上清を各抗体を含むDynabeads（ベリタス）と一晚、混合し、RIPAバッファーで洗浄した。EBバッファーにDynabeadsを懸濁し、65℃で20分間、インキュベートした。上清を回収し、RNaseA、protease Kで処理した。最後にフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿、さらにはPCR purification kit (QIAGEN)でDNAを精製し、qPCRにてDNA量を測定した。

LB1

50 mM HEPES-KOH (pH 7.5)

140 mM NaCl

1 mM EDTA

10 % Glycerol

0.5 % NP-40

0.25 % Triton X-100

protease inhibitor

LB2

20mM Tris-HCl(pH7.5)

200mM NaCl

1mM EDTA

0.5mM EGTA

LB3

20mM Tris-HCl(pH7.5)

150 mM NaCl

1 mM EDTA

0.5 mM EGTA

1 % TritonX-100

0.1 % Na-Deoxycholate

0.1 % SDS

+ Protease Inhibitors (Complete™)

RIPA wash buffer

50 mM HEPES-KOH (pH 7.4)

0.25 M LiCl

1 mM EDTA

0.5 % Na-Deoxycholate

1 % NP-40

TE50

50mM TrisHCl(pH8.0)

10mM EDTA

1%SDS

qPCR プライマー配列

P1: F, TAGACGGAGCTGGAAGGAAA

P1: R, AGGGACAGTCACCACCTTTG

P2: F, AAACCTCTGAGCTCATAATGCTG

P2: R, CTGGGTGCAAGCCCACT

P3: F, AAGAAGTCAAGATTTGGTAGCTTTT

P3: R, TCTCCAAGGACTGTGTGCAG

P4: F, GAGAAGAGGTTGTGCCTGGT

P4: R, TGGTTGCTTCTGGTTCCTG

P5: F, CTTGTGAAAGACGGTGCTTG

P5: R, CAGGGGTGAGAGGAAGGAG

N1: F, TTCTGCAACTAGGTAACACC

N1: R, ATAGGTTGGATTACATGATC

N2: F, ACTGTGGCTGGAAGATGAAT

N2: R, TGCCTTTATGATCATTTAGTGAGT

(10) 次世代シーケンサーによる DNA 解析

DNA 塩基配列の解読には、イルミナ社の HiSeq 2500 システムを用いた。NEBNext ChIP-seq Library Prep Master kit Set(イルミナ社)を使用して、ライブラリーを調製した。DNA 断片の片側を 50-bp、もしくは 65-bp 分を解析した後、Bowtie によってヒトゲノム(UCSC hg19)と比較した。ChIP-seq データの統計処理には、DROMPA を使用した。

4. 結果

4-1A SMC3 アセチル化は S 期には Esco1、Esco2 の両者に依存し、G1 期には、Esco1 のみに依存する。

SMC3 は間期を通じてアセチル化されており、分裂期になると、HDAC8 に脱アセチル化されることで、アセチル化レベルは急激に減少することが知られる (Deardorff et al., 2012)。まず、細胞周期における SMC3 アセチル化の Esco1、Esco2 依存性を調べた。siRNA を用いて、Esco1、Esco2 をそれぞれまたは両方をノックダウンし、ダブルチミジン処理により HeLa 細胞を S 期、または G1 期に同調した。Esco1、Esco2 の siRNA 処理によってそれぞれのタンパク質自身が減少すること、また細胞が目的の細胞周期に同調されていることをウエスタンブロッティング、フローサイトメトリーを用いて確認した (図 1A、1B)。そして、アセチル化された SMC3 を特異的に認識する抗体を用いて (Nishiyama et al., 2010)、SMC3 アセチル化を解析したところ、S 期においては、Esco1、Esco2 片方のノックダウンでは SMC3 アセチル化レベルはほぼ変動しないが、両者をノックダウンすることで大幅にレベルが減少した (図 1C)。一方で興味深いことに、G1 期の SMC3 アセチル化は、Esco2 のノックダウンではほぼ減少しない一方で、Esco1 ノックダウンで大幅に減少した (図 1D)。また、Esco1 ノックダウンによる SMC3 アセチル化の減少は、Esco1、Esco2 の両方をノックダウンした際と同程度であった。これら結果から、S 期においては、Esco1、Esco2 の両者が機能するが、G1 期においては、Esco1 のみが機能していることがわかった。これは、Esco2 の発現は S 期に限定されることと一致する。

4-1B ヒト細胞において、SMC3 のアセチル化には Pds5 が必要である。

近年になって、酵母、マウス細胞を用いた研究から、コヒーシン結合タンパク質 Pds5 が SMC3 アセチル化に必要であることが報告された (Carretero et al., 2013; Chan et

al., 2013; Vaur et al., 2012)。そこでまず、Pds5 の SMC3 アセチル化への関与がヒト細胞でも見られるかどうか検証した。脊椎動物では、Pds5 は Pds5A と Pds5B の2つのパラログが存在している(Losada et al., 2005)。siRNA 処理により、HeLa 細胞中の Pds5A、Pds5B のタンパク量が、80%程度減少した(図 1A)。この条件で、細胞をダブルチミジン処理により S 期後期、または G1 期に同調したところ(図 1B)、S 期の SMC3 のアセチル化はほぼ減少しない一方、G1 期のアセチル化量は減少することがわかった(図 1C、1D)。このとき、Pds5A、Pds5B の両方をノックダウンすることにより、アセチル化量はさらに減少した(図 1D)。この結果から、ヒト細胞においても、SMC3 アセチル化は Pds5 に依存し、Pds5A、Pds5B の両者がともに必要であることがわかった。

4-1C Esco1 は、SMC3 をアセチル化するために Pds5 を必要とする。

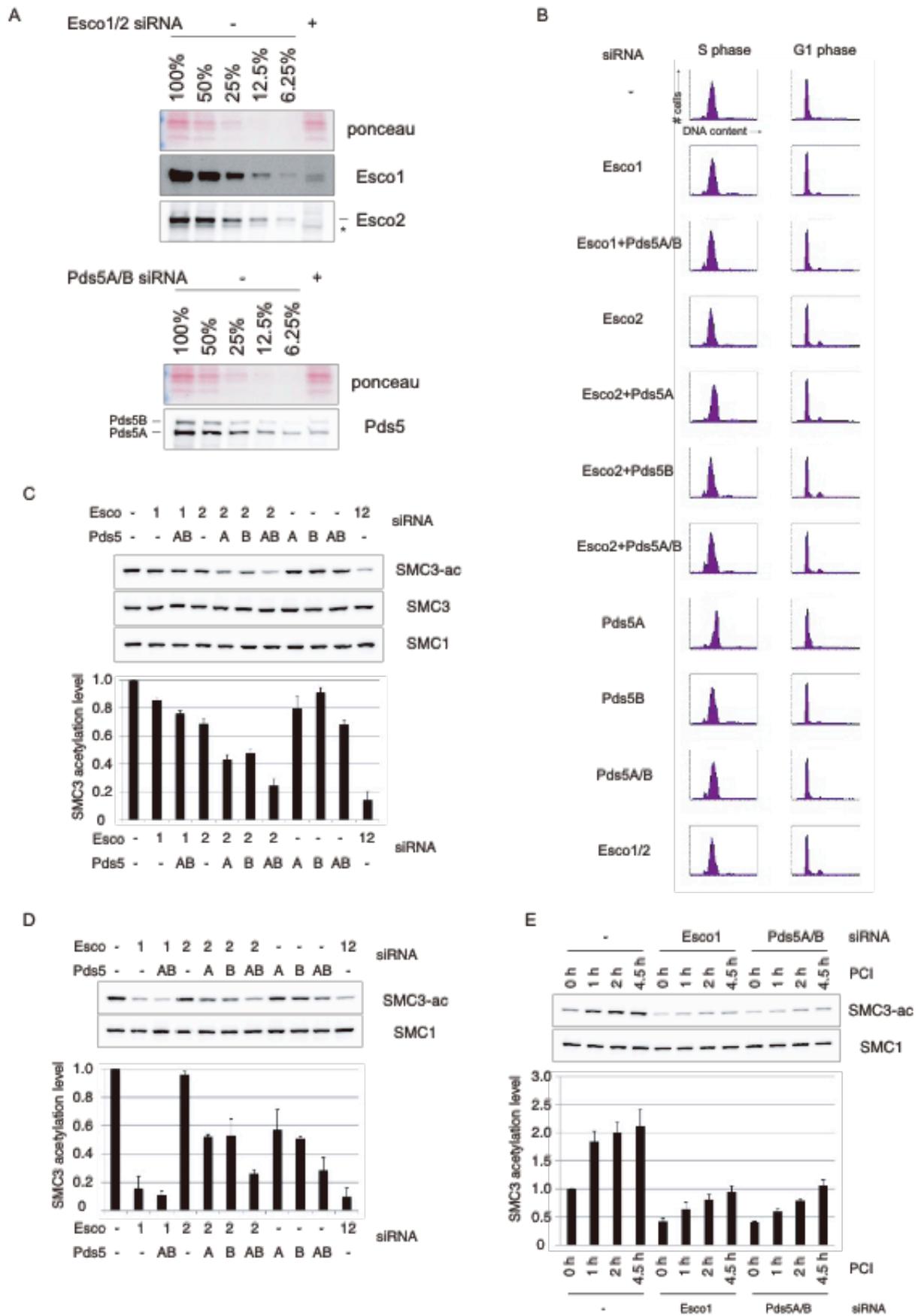
SMC3 は、Esco1、Esco2 によってアセチル化されるので、Pds5 と Esco1、Esco2 の関連を調べるため、これらを組み合わせてノックダウンし、SMC3 アセチル化の変動を調べた。その結果、S 期において、Esco1 のノックダウンに対して、Pds5A、Pds5B 両者のノックダウンをかけ合わせても、SMC3 アセチル化レベルに加算的な減少は見られなかったが、Esco2 のノックダウンに Pds5A、Pds5B のノックダウンをかけ合わせると、Esco1、Esco2 両因子のノックダウンと同等レベルにまで、アセチル化レベルは減少した(図 1C)。この結果は、Esco1 と Esco2 による SMC3 アセチル化機構は異なることを示しており、また Esco1 による SMC3 のアセチル化には、Pds5 が必要であることがわかった。

それでは、Pds5 はどのように Esco1 による SMC3 アセチル化を制御しているのだろうか。Pds5 ノックダウンによって、Esco1 による SMC3 アセチル化自体が阻害されている可能性と、HDAC8 によるアセチル化 SMC3 の脱アセチル化が過剰に起こってい

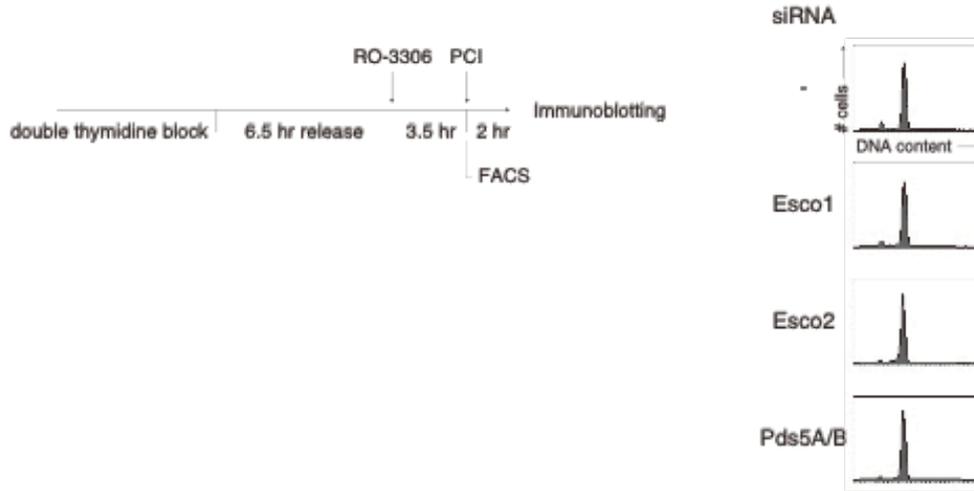
る可能性が考えられた。これらの可能性を区別するため、Pds5 をノックダウンし、HDAC8 阻害剤 PCI-34051 (以下、PCI とする) で細胞を処理し、SMC3 アセチル化レベルの変動を解析した。まず、ノックダウンをしていない細胞では、先行研究通り (Deardorff et al., 2012)、SMC3 のアセチル化量は PCI 処理により増加した(図 1E)。そして、この SMC3 アセチル化の増加は、Esco1 ノックダウンにより抑制され、興味深いことに、Pds5 ノックダウンによっても抑制された。以上の結果から、Pds5 が SMC3 アセチル化を促進していると考えた。

4-1 D Esco1 は、DNA 複製後においても、SMC3 をアセチル化する。

Esco1 は細胞周期を通じて存在しており、DNA 複製前の G1 期にも SMC3 をアセチル化することがわかった。そこで今度は、DNA 複製後に新規に SMC3 アセチル化が起こっているのかどうか、またその場合に、Esco1、Esco2 のどちらがそのアセチル化を担っているのか検証した。まず、細胞を Cdk1 阻害剤である RO-3306 で処理し、G2/M 期に同調し、その後、PCI を処理した。G2/M 期に細胞が同調されていることはフローサイトメトリーで確認した(図 1 F)。もし、DNA 複製後にも新規に SMC3 がアセチル化されているならば、PCI 処理によって、SMC3 アセチル化は増加すると推測される。そして、実際に SMC3 アセチル化レベルの増加が観察された (図 1 G)。また、PCI 処理による SMC3 のアセチル化の増加は、Esco2 をノックダウンしても観察されるが、興味深いことに Esco1 のノックダウンによって抑制された。Pds5 ノックダウンによっても、Esco1 ノックダウンと同様の効果が得られ、これは、Esco1 による SMC3 アセチル化は Pds5 を必要とすることと一致している。



F



G

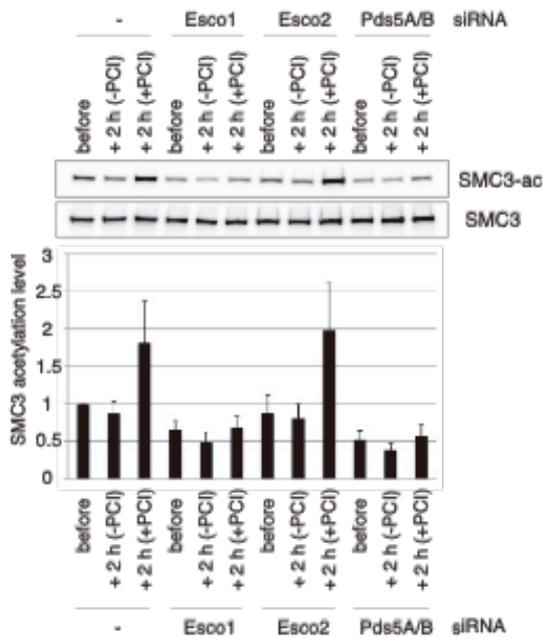


図 1

(A) Esco1、Esco2、Pds5A、Pds5B のノックダウン効率の検証

それぞれ siRNA を HeLa 細胞に処理し、2 日間培養した。その後、全細胞抽出液を回

収し、ウエスタンブロッティングで、タンパク量を検出した。siRNA 無処理の細胞抽出液を希釈し、標準液として使用した。ローディングコントロールとして、ponceau 染色を用いた。

(B) Esco1、Esco2、Pds5A、Pds5B ノックダウン細胞の細胞周期の解析

それぞれの siRNA で細胞を処理した後、ダブルチミジン処理により S 期初期に同調した。培地交換によってリリースした後、細胞を回収し、PI 染色後、DNA 含有量をフローサイトメトリーにて解析した。

(C、D) SMC3 アセチル化の Esco1、Esco2、Pds5A、Pds5B 依存性の検証

(B)で回収した細胞から細胞抽出液を作製し、ウエスタンブロッティングにより SMC3 アセチル化を検出した。それぞれ、S 期 (C)、もしくは G1 期 (D)に同調している。アセチル化 SMC3 に加え、ローディングコントロールとして SMC1、SMC3 のバンド強度を計測し、SMC3 アセチル化量を定量した。本実験を細胞回収から 3 度行い、SMC3 アセチル化量の平均値と標準偏差を下に示している。siRNA 無処理の細胞での SMC3 アセチル化レベルを 1 とした。

(E) PCI 処理による SMC3 アセチル化量の増減の解析

細胞をそれぞれの siRNA で処理し、1 時間、2 時間、4.5 時間、PCI 存在下で培養した。細胞抽出液を作製し、ウエスタンブロッティングにおける SMC3 アセチル化バンドの強度を測定した。ローディングコントロールとして SMC1、SMC3 を使用し、また独立して行った 3 度の実験結果から、SMC3 アセチル化量の平均値と標準偏差を算出した。siRNA、PCI 無処理の細胞での SMC3 アセチル化レベルを 1 とした。

(F、G) G2/M 期における新規 SMC3 アセチル化の解析の実験概略図、細胞周期の解析

(F)、および SMC3 アセチル化量の検出(G)

細胞をダブルチミジン処理により、S 期初期に同調後、培地交換によってリリースし、さらに Cdk1 阻害剤の RO-3306 を用いて G2/M 期に同調した。同調性は、右図におい

て、フローサイトメトリー(FACS)を用いて確認した(F)。これら G2/M 期の細胞をさらに PCI により 2 時間処理し、SMC3 アセチル化量の増加をウエスタンブロッティングで解析した(G)。PCI 処理前(before)、2 時間の PCI 処理後(±PCI)にそれぞれの細胞を回収した。本実験は独立して 3 度行っており、SMC3 アセチル化量の平均値と標準偏差を算出した。siRNA 無処理の細胞における PCI 処理前の SMC3 アセチル化レベルを 1 としている。

4-2 Sororin は Esco2 によってアセチル化されたコヒーシンのアセチル化状態の維持に必要である。

高等真核生物では、SMC3 アセチル化が Sororin のクロマチン結合に必要であることが知られている(Nishiyama et al., 2010)。そこで、Sororin が SMC3 アセチル化を制御するかどうか、検証した。Sororin をノックダウンし、G2 期に細胞を同調したところ、先行研究と同様、SMC3 のアセチル化量はほぼ変化しなかった (図 2 A)。興味深いことに、Sororin のノックダウンに Esco2 のノックダウンをかけ合わせても、SMC3 アセチル化量はほぼ変わらなかったが、Esco1 と Sororin のノックダウンをかけ合わせると、SMC3 のアセチル化量は減少した (図 2 A)。以上の結果は、Sororin が Esco2 による SMC3 アセチル化に必要であることを示している。

Sororin が SMC3 アセチル化の導入に必要であるのか、またはアセチル化された SMC3 を HDAC8 から保護するために必要であるのか、区別するため、Esco1 と Sororin をノックダウンした細胞を PCI 処理し、SMC3 アセチル化量を解析した (図 2 B、2 C)。その結果、PCI を処理することによって、Esco1 と Sororin をノックダウンしても、SMC3 アセチル化の減少はほぼ見られなくなった。Sororin ノックダウン下では、Esco2 によってアセチル化されたコヒーシンが HDAC8 によって脱アセチル化される可能性が考えられた。

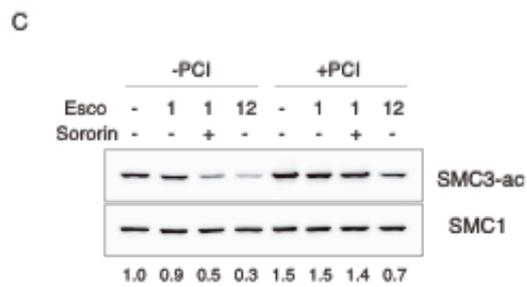
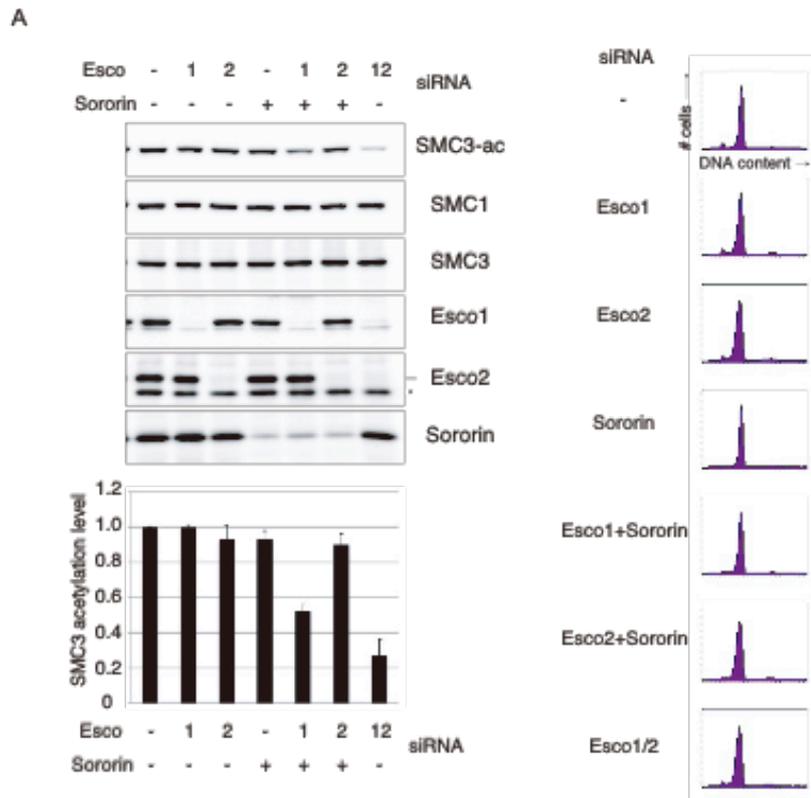


図 2

(A) SMC3 アセチル化の Sororin 依存性の検証

Esco1、Esco2、Sororin を siRNA を用いてノックダウンした後、細胞を G2 期に同調

し、SMC3 アセチル化量をウェスタンブロッティングにより検証した(左)。アセチル化 SMC3 に加え、ローディングコントロールとして SMC1 または SMC3 のバンド強度を計測し、SMC3 アセチル化量を定量した。本実験を細胞回収から 3 度行い、SMC3 アセチル化量の平均値と標準偏差を下に示している。細胞周期はフローサイトメトリーを用いて解析した(右)。

(B、C) Sororin ノックダウン細胞において PCI 処理した際の SMC3 アセチル化量の検証

実験概略を(B)に示す。まず、siRNA を用いてノックダウンし、ダブルチミジン処理による同調後、培地交換によるリリースを行った。その 2 時間後、PCI を添加し、さらに 4 時間細胞を培養した。そして、細胞抽出液から SMC3 のアセチル化量を解析した(C)。

SMC1 をローディングコントロールとして、SMC3 アセチル化レベルを定量し、ウェスタンブロッティングデータの下に示した。

4-3 Esco1 による Sororin のクロマチン結合の安定化には、Pds5 が必要である。

今度は、Sororin のクロマチン結合の Esco1/2 依存性を検証した。先行研究から、Esco1、Esco2 の両因子を HeLa 細胞においてノックダウンすると、マウスの Sororin プロモーターから発現させたマウス Sororin タンパク質のクロマチン結合が減少することが報告されているが(Nishiyama et al., 2010)、Esco1、Esco2 それぞれの寄与や、内在性の Sororin の動態は不明であった。そこで、Esco1、Esco2 それぞれ、または両方をノックダウンし、クロマチン分画後、Sororin 抗体を用いて内在 Sororin のクロマチン結合をウエスタンブロッティングで解析した。その結果、内在 Sororin のクロマチン結合は、100mM の塩化ナトリウムを含む溶解液においては、Esco1、Esco2 の両因子をノックダウンしても、ほぼ変化しなかったが (図 3A)、250mM の塩化ナトリウムを含む溶解液で処理することによって、減少することがわかった (図 3B、3C)。これら結果から、Esco1、Esco2 は、Sororin のクロマチン結合を安定化していると考えている。250mM の塩化ナトリウムを含む溶解液で処理した際のクロマチン結合は、Esco1 のみをノックダウンしても、ほぼ変化しないが、Esco2 ノックダウンにより減少することから、Sororin のクロマチン結合は Esco2 の寄与が Esco1 に比べ、大きいと考えられる (図 3C)。また、Esco2 遺伝子の異なる領域を標的とする siRNA を用いても、Sororin のクロマチン結合は減少することを確認した (図 3D)。

一方、Pds5 ノックダウンは、250mM 塩化ナトリウムを含む溶解液においても、Sororin のクロマチン結合にほぼ影響しなかった (図 3C)。しかしながら、興味深いことに、Pds5 ノックダウンと Esco1 ノックダウンを組み合わせても、Sororin のクロマチン結合はほぼ変化しなかったが、Pds5 と Esco2 を合わせてノックダウンすることにより、Sororin のクロマチン結合は大きく減少した (図 3C)。この結果は、Sororin のクロマチン結合は SMC3 アセチル化を必要とすること、また Esco1 による SMC3 アセ

チル化には Pds5 が必要であることと一致している。

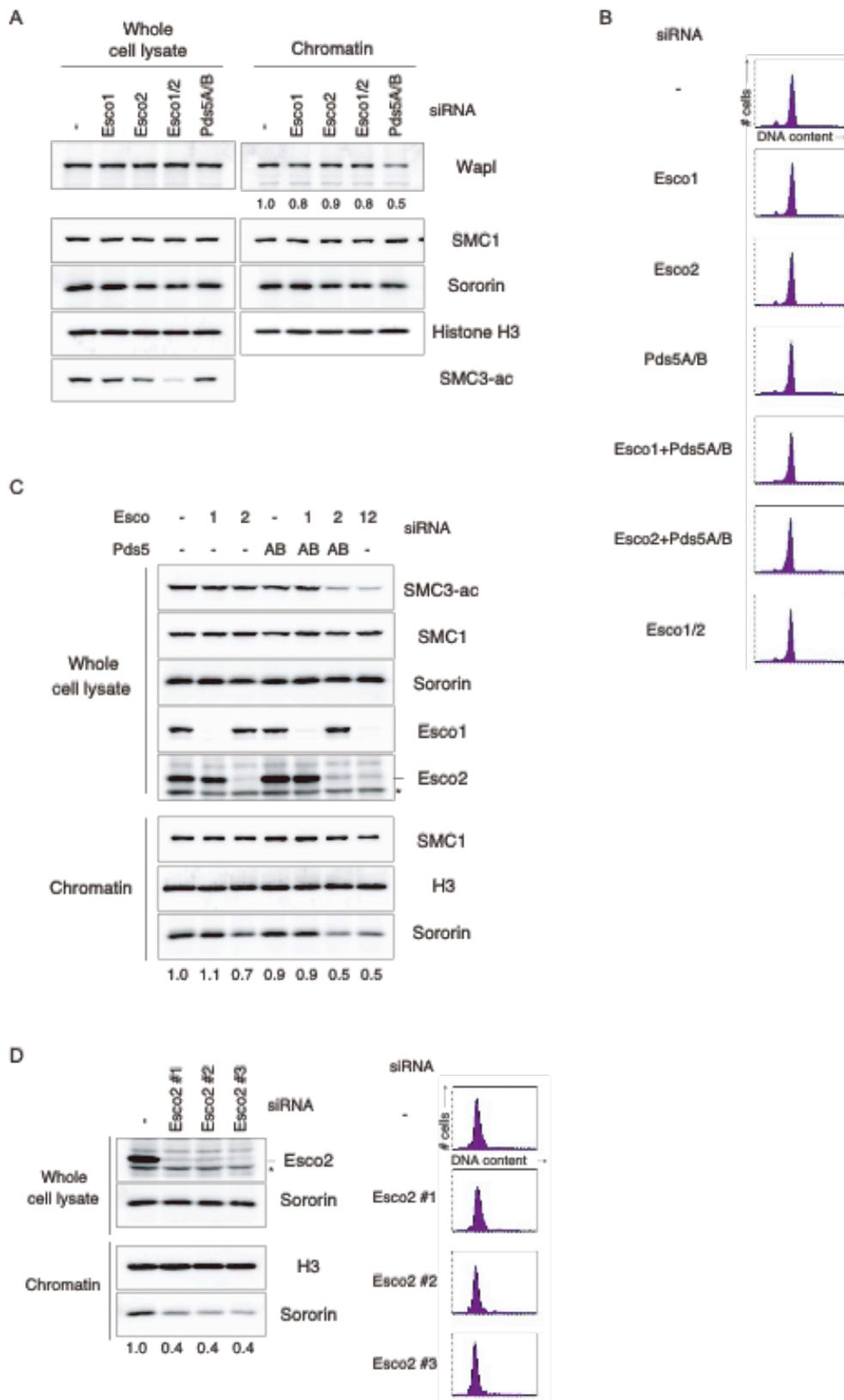


図 3

(A、B、C) Wapl、Sororin のクロマチン結合における Esco1、Esco2、Pds5A、Pds5B 依存性の検証

siRNA を用いて、Esco1、Esco2、Pds5A、Pds5B のノックダウンを行った後、150mM (A)、250mM (C)の塩化ナトリウムを含む溶解液を用いて、クロマチン分画法を行った。全細胞抽出液(Whole cell lysate)とクロマチン画分(Chromatin)の各タンパク質をウエスタンブロッティングで検出した。ローディングコントロールとして、Histone H3 を用いて、クロマチン画分の Sororin を定量し、Sororin のウエスタンブロッティングバンドの下に示した。(C)の実験における細胞周期の解析結果を(B)に示している。

(D) Sororin のクロマチン結合の Esco2 依存性の検証

Esco2 の異なる領域を標的とする 3 種類の siRNA を用いて Esco2 をノックダウンし、250mM の塩化ナトリウムを含む溶解液で、Sororin のクロマチン結合を解析した(左)。ローディングコントロールとして、Histone H3 を用いて、クロマチン画分の Sororin を定量し、Sororin のウエスタンブロッティングバンドの下に示した。フローサイトメトリーを用いて細胞周期を解析した結果を右に示す。

4-4 Esco1 と Pds5 は協調的に姉妹染色分体間接着を確立する。

次に、Esco1、Esco2、Pds5 のノックダウンによる SMC3 のアセチル化の減少と、姉妹染色分体間接着形成率の相関を解析した (図 4)。まず、Esco1、Esco2 をそれぞれ単体でノックダウンしたところ、コヒージョンに重篤な欠損を示す細胞の割合は、わずかながら増加し、両因子ノックダウンすると、ほとんどの細胞でコヒージョン欠損が観察された。また、Pds5A、Pds5B の片方をノックダウンしても、コヒージョン欠損の割合は増加しないが、Pds5 両因子をノックダウンすると、この割合はわずかに増加した。Esco1、Esco2、Pds5 の相関を検証するため、それぞれを組み合わせでノックダウンし、同様に姉妹染色分体間接着形成率を計測したところ、Esco1 と Pds5 のノックダウンをかけ合わせても、割合に増加は見られなかったが、Esco2 と Pds5 のノックダウンをかけ合わせると、その割合は相乗的に増加し、Esco1、Esco2 の両因子をノックダウンした際と同程度になった。コヒージョンが欠損する細胞の割合は、SMC3 アセチル化レベルの変化と逆相関しており、SMC3 のアセチル化がコヒージョン形成に必要であることと一致する。

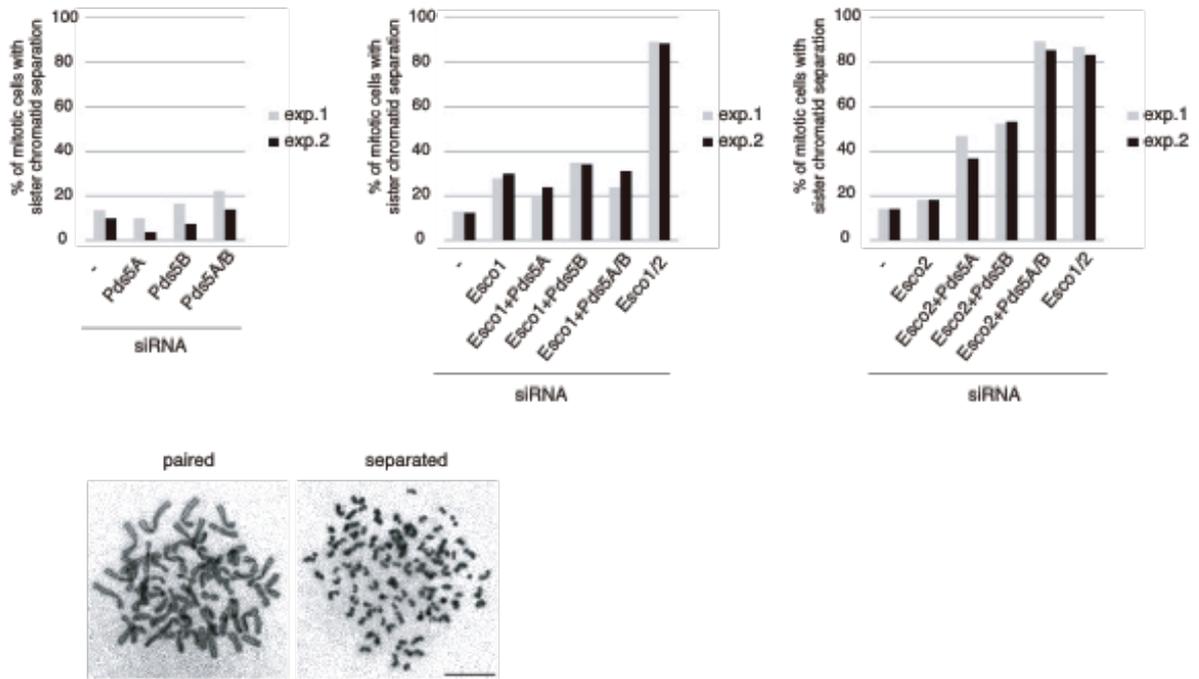


図4 姉妹染色分体間接着形成における Esco1、Esco2、Pds5 依存性の検証

Esco1、Esco2、Pds5 をそれぞれノックダウンした後、細胞培養容器を叩くことで、接着の弱くなった分裂期の細胞を選択的に回収した。その後、染色体をギムザ染色法により染色後、姉妹染色分体間の接着を保っているもの(paired)、保っていないもの(single)の2群に分別し、染色体が姉妹染色分体間の接着を保っていない細胞の割合を算出した。

4-5 Pds5 は Esco1 選択的に結合する。

Esco1、Esco2 とコヒーシン構成タンパク質 SMC3、Rad21、SA1、SA2、Pds5A、Pds5B との物理的相互作用を解析した。昆虫細胞において、Esco1 または Esco2 に加え、SMC3、Rad21、SA1、SA2、Pds5A、Pds5B をそれぞれ共発現させた後、Esco1、Esco2 を免疫沈降により回収した。それぞれのコヒーシン構成タンパク質が共沈するかどうか検証したところ、Esco1 と SA1、SA2、SMC3 の結合は観察されず (図 5 A、5 B)、また、Esco1 と Rad21、Esco2 と Rad21 の結合は弱いながらも検出された (図 5 C)。興味深いことに、Esco2 は Pds5A と共沈しない一方で、Esco1 は Pds5A と共沈した。Pds5A は、Esco1 選択的に相互作用すると考えられる (図 5 D)。また、Esco1 は Pds5B とも相互作用した (図 5 E)。これらの結果は、ヒト細胞において、Pds5 が Esco1 による SMC3 のアセチル化に必要であることと一致すると考えている。

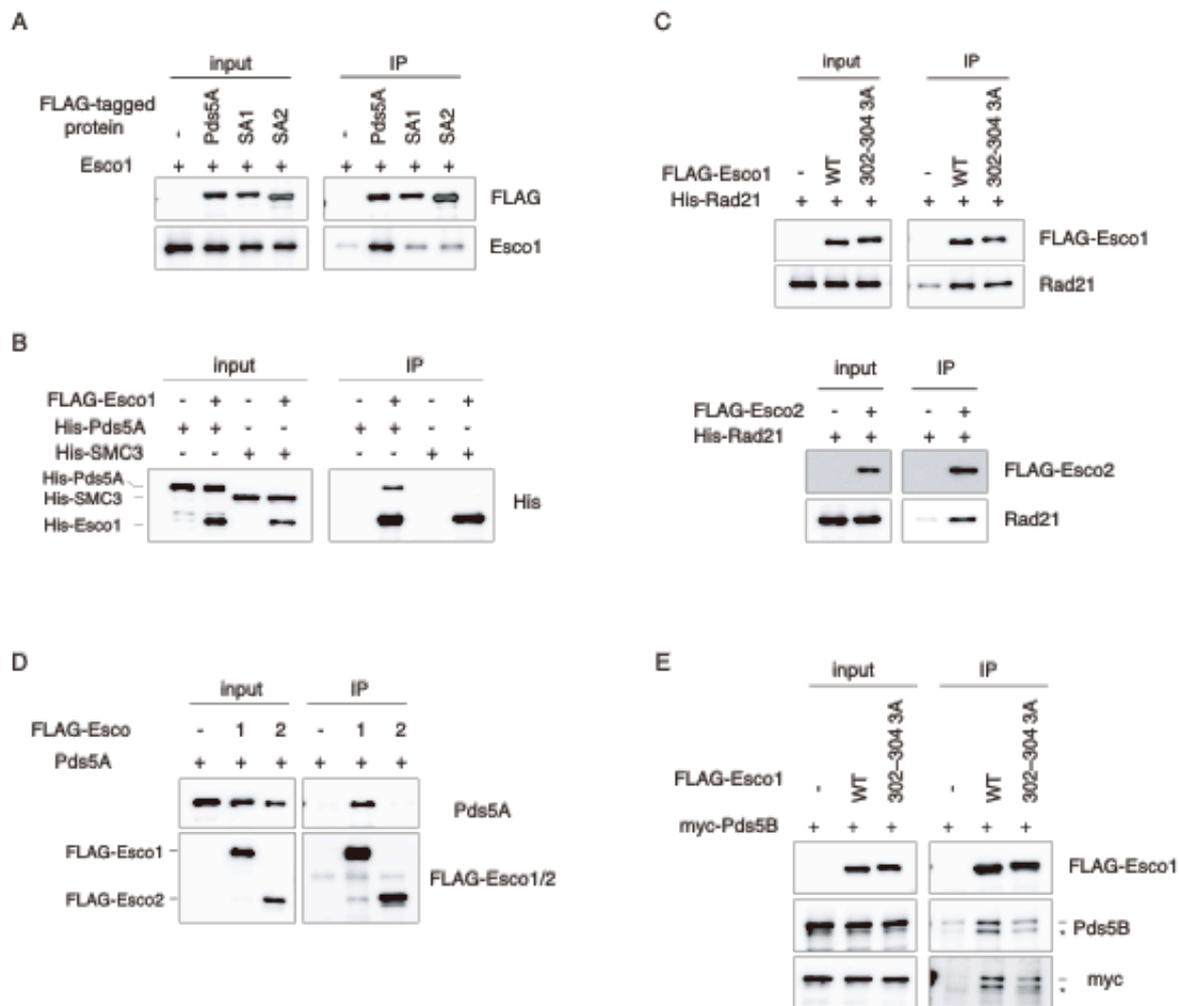


図 5

(A、B) Esco1 と SA1、SA2、SMC3 の物理的相互作用の解析

昆虫細胞において、バキュロウイルスを用いて、Esco1 と SA1、SA2、SMC3 タンパク質を同時に発現させた。そして M2 抗体を用いて、FLAG タンパク質を免疫沈降し、一方のタンパク質が共沈するか調べた。ポジティブコントロールとして、Esco1、Pds5A 間の結合を観察した。

(C) Esco1、Esco2 と Rad21 の物理的相互作用の解析

昆虫細胞において、Rad21 と FLAG-Esco1 野生型、もしくは Pds5 と結合できない変

異 FLAG-Esco1(302-304 3A)、FLAG-Esco2 を大量発現させ、FLAG 抗体を用いて免疫沈降し、Rad21 が共沈するか調べた。

(D) Esco1、Esco2 と Pds5A の物理的相互作用の解析

昆虫細胞において、FLAG-Esco1、FLAG-Esco2 と Pds5A を共発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降後、Pds5A の共沈を解析した。

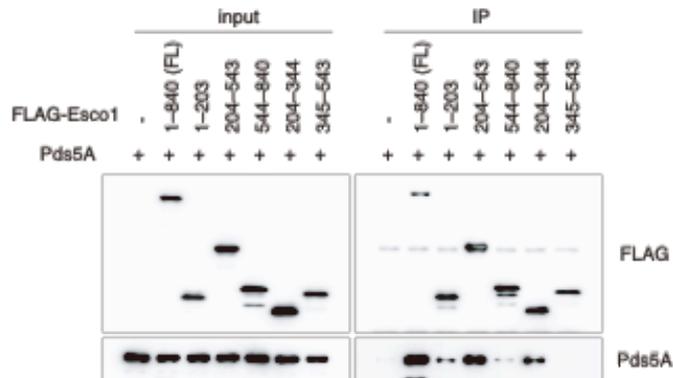
(E) Esco1 と Pds5B の物理的相互作用の解析

昆虫細胞において、FLAG-Esco1 と Pds5B を共発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降後、Pds5B の共沈を解析した。

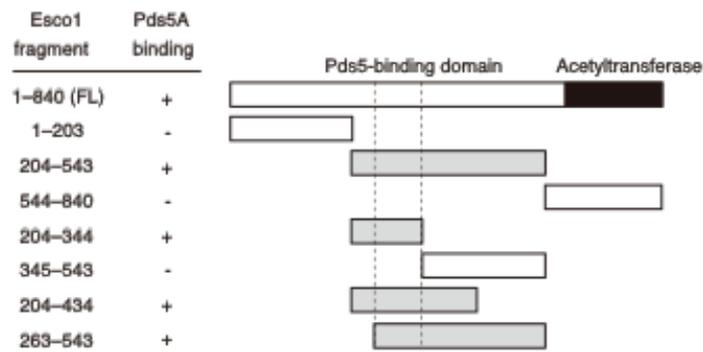
4-6 **Esco1** は、その中央領域を介して、**Pds5** と結合する。

Esco1 がどの領域で **Pds5** と相互作用するのかを明らかにするため、**Esco1** の断片を作製し、**Pds5A** との結合能の有無を解析したところ、**Esco1** の 266 番目のアミノ酸から 344 番目のアミノ酸領域が **Pds5A** との相互作用に必要であることがわかった (図 6 A、6 B)。この領域は、**Esco2** との相同性が低いことが報告されている。そして、**Esco1** の当該領域のアミノ酸配列の保存性を検証した結果、当該領域内にヒトからアフリカツメガエルまで、高度に保存されたアミノ酸配列を見出した (図 6 C)。**Esco1** が当該領域を介して **Pds5** と相互作用する可能性を検証するため、この領域内の 3 アミノ酸をアラニンに置換した **Esco1** 変異体を 6 つ作製し、それぞれ **Pds5A** との相互作用を検証した (図 6 D)。そして、302-304 番目、もしくは 315-317 番目のアミノ酸をアラニンに置換することによって、**Pds5A** との相互作用が減少することが判明した。また、302-304 番目のアミノ酸をアラニンに置換することによって、**Pds5B** との相互作用も減少することから (図 5 E)、**Esco1** の当該領域は **Pds5B** との相互作用にも必要であると考えている。一方で、この変異は **Rad21** との相互作用には影響しないことから (図 5 C)、**Esco1** は **Pds5** とは異なる領域を介して、**Rad21** と結合すると考えられる。

A



B



C

Species	Protein	Residue	302-304	315-317	Residue
<i>Homo sapiens</i>	ESCO1	292	LEQAGKSKRG	SILQLCEEIAGEIE	ESDNVEVKKESSQMES 330
<i>Mus musculus</i>	ESCO1	295	LEQAGKSKRG	SILQLCEEIAGEIE	SDTVEVKKESSCVES 333
<i>Gallus gallus</i>	ESCO1	314	PESDVKSKRV	SILQLCEEIAGEIE	SDTVEVKKDSFNAEC 352
<i>Xenopus laevis</i>	ESCO1	431	LPDVPTAKRI	SILDLCEIAGEIE	SDTVEVKKDMFSSQD 469
<i>Homo sapiens</i>	ESCO2	185	AENNSNAPRV	LSQKIKPQVTLQGG	AFFVRKKSLSLRKSS 223

D



図 6

(A、B) Esco1 の Pds5A 相互作用領域の同定

昆虫細胞において、Pds5A と同時に FLAG-Esco1 の全長、もしくは FLAG-Esco1 断片を発現させ、FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。Pds5A の共沈をウエスタンブロッティングで検出した(A)。(B)にその結果をまとめており、Pds5A との結合が見られた断片を灰色で示した。また、点線で囲まれた領域を Pds5A との相互作用領域とした。

(C) Esco1 の Pds5 相互作用領域中のアミノ酸配列の保存性

Homo sapiens(ヒト)、*Mus musculus*(ハツカネズミ)、*Gallus gallus*(セキショクヤケイ)、*Xenopus laevis*(アフリカツメガエル)の Esco1 における、Pds5 相互作用領域中の保存性の高い箇所のアミノ酸配列を比較した。並列して、Esco2 の対応する領域のアミノ酸配列も示した。

(D) Esco1 の Pds5 相互作用領域中の変異が Pds5 への結合に及ぼす影響

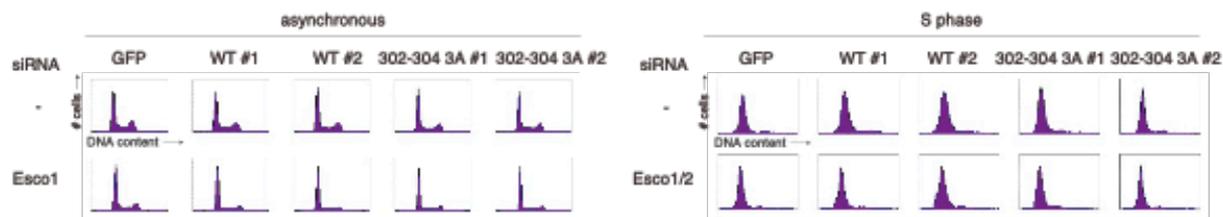
Pds5 相互作用領域中の 3 アミノ酸をアラニンに置換した Esco1 と Pds5A を昆虫細胞で共発現させ、Esco1 を免疫沈降により回収した。Pds5A の共沈をウエスタンブロッティングによって解析した。

4-7 Esco1 は、Pds5 との結合を介して、SMC3 をアセチル化する。

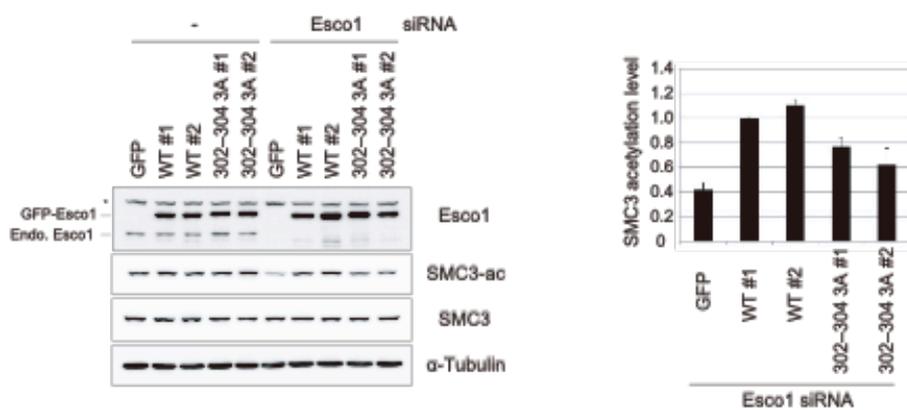
Esco1 と Pds5 の相互作用が姉妹染色分体間接着に必要かどうか検証すべく、GFP のみ、GFP タグの付いた Esco1 (GFP-Esco1)の野生型、もしくは Pds5 と結合しない変異型 GFP-Esco1 を安定的に発現する HeLa 細胞を作製した。野生型 Esco1 と変異 Esco1 の発現量は、ほぼ同等であることを確認した (図 7 A)。内在性の Esco1 のみ、もしくは内在性 Esco1、Esco2 の両方を siRNA によってノックダウンすることで、GFP タグの付いた Esco1 と内在 Esco1 を細胞内で置換し、SMC3 のアセチル化を解析した。その結果、どちらの場合においても、Pds5 と結合を弱める変異を施すことにより、Esco1 による SMC3 アセチル化効率は、わずかであるが、減少した (図 7 A、7 B、7 C)。以上の結果から、Esco1 と Pds5 の結合は、SMC3 アセチル化に必要であることがわかった。

次に、Pds5 と結合できない Esco1 変異型がアセチル化活性を保持しているかどうか検証した。昆虫細胞において、Esco1 と SMC3 を共発現させ、SMC3 アセチル化レベルの変動をウエスタンブロッティングで解析した (図 7 D)。SMC3 を Esco1 と同時に発現させることにより、SMC3 アセチル化レベルは大きく亢進し、また、Esco1 のアセチルトランスフェラーゼ内に存在する 768 番目のグリシンをアスパラギン酸に置換することで、その亢進は見られなくなった。このことより、この実験系において、Esco1 の活性を解析できると考えている。そこで、Pds5 と結合できない Esco1 のアセチル化活性を計測したところ、野生型 Esco1 と同程度、SMC3 をアセチル化できた。また、Pds5A を SMC3、Esco1 に加えて発現させても、SMC3 のアセチル化レベルは亢進しなかった (図 7 E)。以上の結果より、Pds5 は Esco1 のアセチル化活性自体には必要ではなく、また Pds5 と結合できない Esco1 もアセチル化活性は保持していると考えられた。

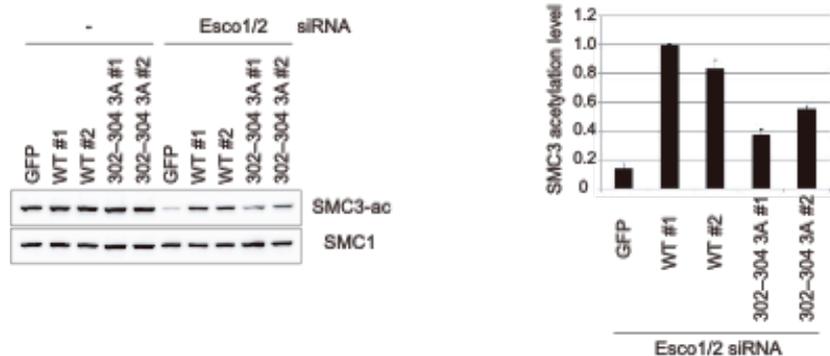
A



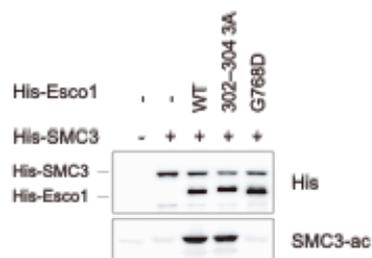
B



C



D



E

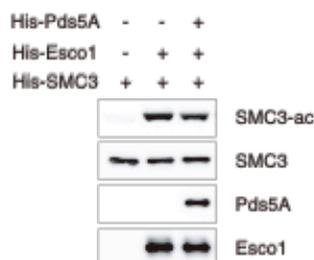


図 7

(A、B、C) Esco1 の Pds5 との相互作用が SMC3 アセチル化に及ぼす影響

GFP、GFP-Esco1 野生型、もしくは Pds5 と結合できない変異 Esco1 を発現する HeLa 細胞株を樹立した。これら細胞において、Esco1 のみ、もしくは Esco1、Esco2 の両者をノックダウンし、非同調(B)、もしくは S 期(C)にそれぞれ細胞を同調し、SMC3 アセチル化量をウエスタンブロッティングで解析した。フローサイトメトリーから得られた細胞周期を(A)に示す。ウエスタンブロッティングにおけるバンドの強さから SMC3 アセチル化量を定量した。この実験を 3 度独立して繰り返しており、SMC3 アセチル化量の平均値と標準偏差を示す。

(D) Esco1 変異が Esco1 のアセチル化活性に及ぼす影響の解析

昆虫細胞において、SMC3 と同時に、Esco1 の野生型、Pds5 と結合できない変異 Esco1(302-304 3A)、もしくはアセチルトランスフェラーゼドメインに変異を導入した Esco1(G768D) を発現させ、SMC3 のアセチル化量をウエスタンブロッティングで解析した。

(E) Pds5A が Esco1 のアセチル化活性に及ぼす影響の解析

昆虫細胞において、SMC3 と Esco1 に加え、Pds5A を発現させ、Esco1 による SMC3 アセチル化量の変動をウエスタンブロッティングで解析した。

4-8 Esco1 と Pds5 の結合は、姉妹染色分体間接着の形成に必要である。

今度は、Esco1 と Pds5 の結合がコヒージョン形成に必要かどうか解析した。先ほどと同様、GFP のみ、GFP-Esco1 の野生型、もしくは Pds5 と結合できない変異型を発現する細胞株を用意し、内在性の Esco1、Esco2 の両方を siRNA によりノックダウンした (図 8)。それぞれの細胞で分裂期染色体の形状を観察したところ、Esco1、Esco2 をノックダウンすることにより、コヒージョン欠損を示す細胞は著しく増加し、その表現型は、野生型 Esco1 を発現させることで、大きく解消された。その一方で、変異 Esco1 はこのコヒージョン欠損の表現型を部分的にのみ解消した。以上の結果から、Esco1 と Pds5 の結合は、姉妹染色分体間接着の確立に必要であると結論した。

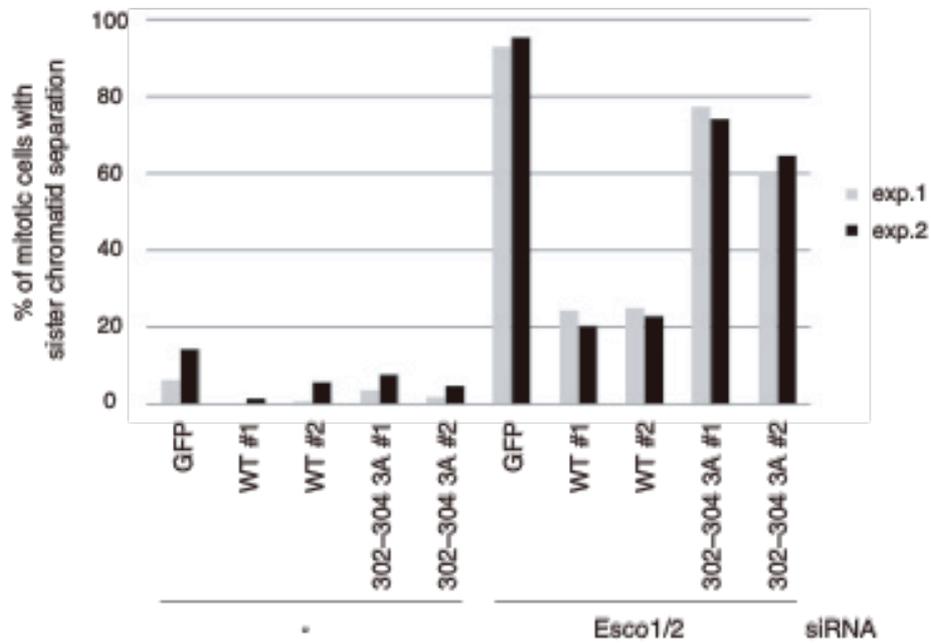


図8 Esco1 と Pds5 の相互作用が姉妹染色分体間接着形成に及ぼす影響の解析

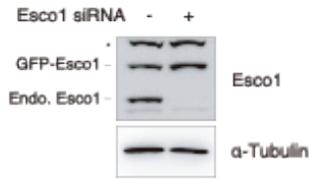
図7(A-C)で使用した細胞において、Esco1、Esco2 をノックダウンし、分裂期染色体を回収、ギムザ染色した。染色体の形状を観察し、姉妹染色分体間の接着が見られないものの割合を算出した。本実験は独立して2度繰り返しており、それぞれの結果を示している。

4-9 Esco1 は間期を通じて、染色体上でコヒーシと共局在する。

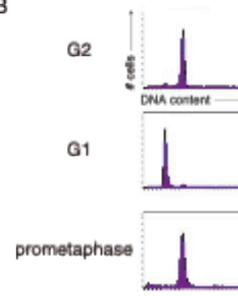
次に、ChIP-sequencing 法を用いて、Esco1 の染色体上での結合部位を網羅的に同定することを目指した。当研究室で作製した Esco1 抗体はクロマチン免疫沈降法には適さなかったため、内在性 Esco1 と同程度の GFP-Esco1 を安定的に発現する細胞を用意し（図 9 A）、内在性の Esco1 をノックダウンした上で、GFP 抗体による ChIP-sequencing を行った。今回は、同時に Rad21、Pds5A を特異的に認識する抗体を用いて、それぞれの局在も合わせて解析した（図 9 B、C）。その結果、Esco1、Rad21、Pds5A の局在部位として、G1 期では、それぞれ 12386、27333、24592 個、G2 期ではそれぞれ 11797、29958、24127 個の局在部位が同定された。これらタンパク質の局在と遺伝子領域との相関を調べたところ、3 タンパク質ともに遺伝子の上流、下流にわずかに濃縮したものの、大きな相関は見られなかった（図 9 D）。さらに、コヒーシの局在は G1 期と G2 期でほぼ変化せず、分裂期になると、局在部位数は大幅に減少することがわかった（図 9 C、E）。この結果は、先行研究と一致している。また、本研究から、Esco1 の局在に関しても、G1 期と G2 期の間でほぼ変化せず、分裂期に大幅に減少することがわかった（図 9 C、E）。

興味深いことに、Esco1 とコヒーシは、G1 期、G2 期のどちらにおいても、共局在していた（図 9 C、G、H）。さらに、細胞周期における Esco1 の局在の変化を ChIP-qPCR によってより詳細に解析したところ、間期を通じて、Esco1 はコヒーシ局在部位に集積し、分裂期になると、その領域から離れていることがわかった（図 9 I、J）。

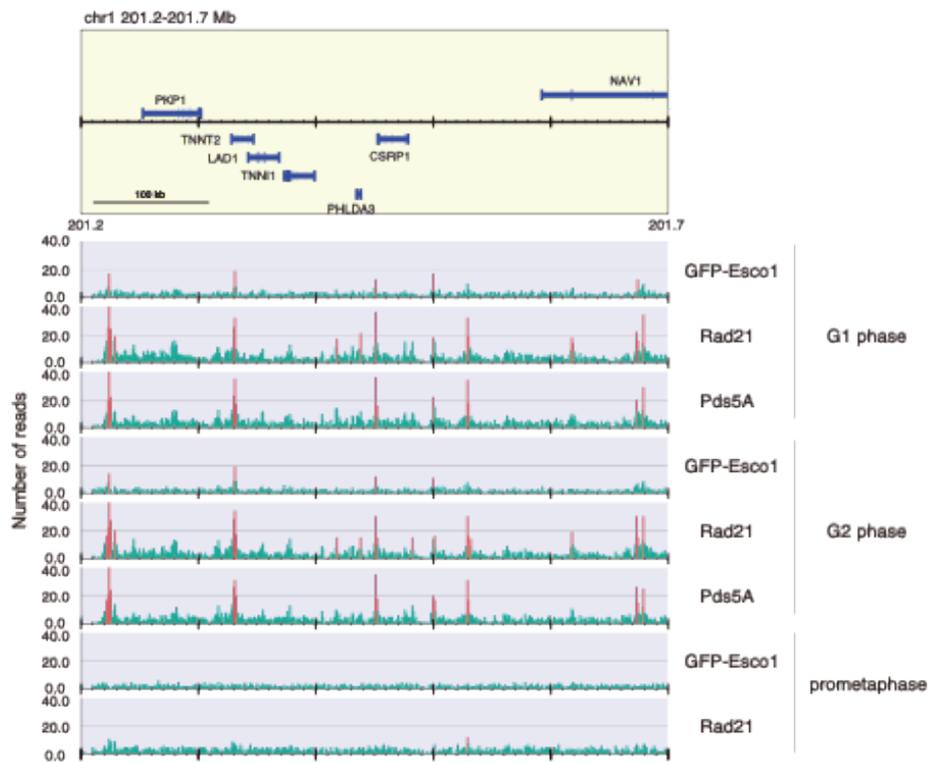
A



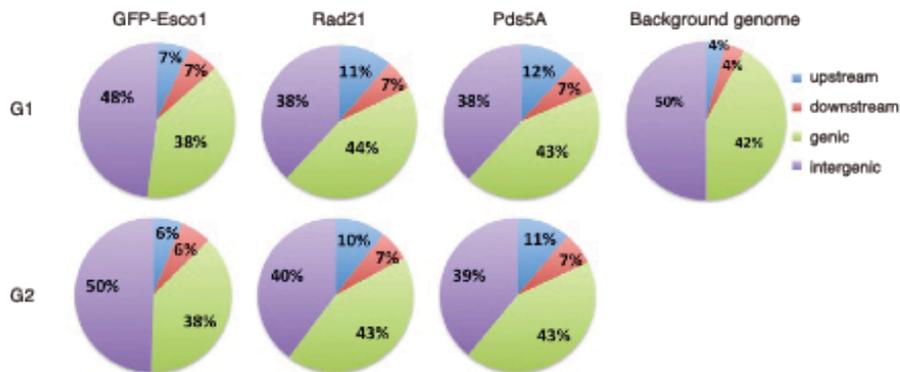
B

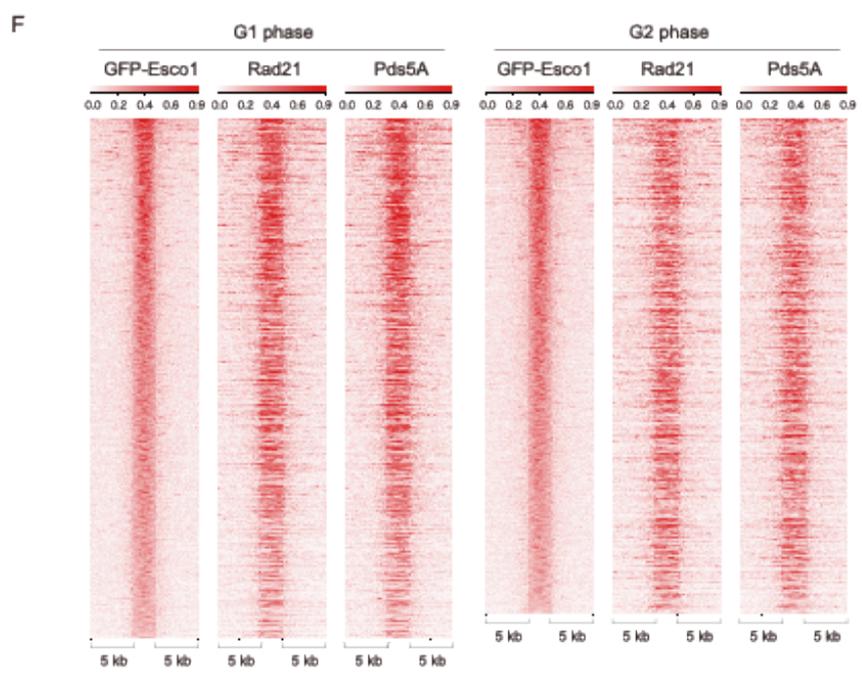
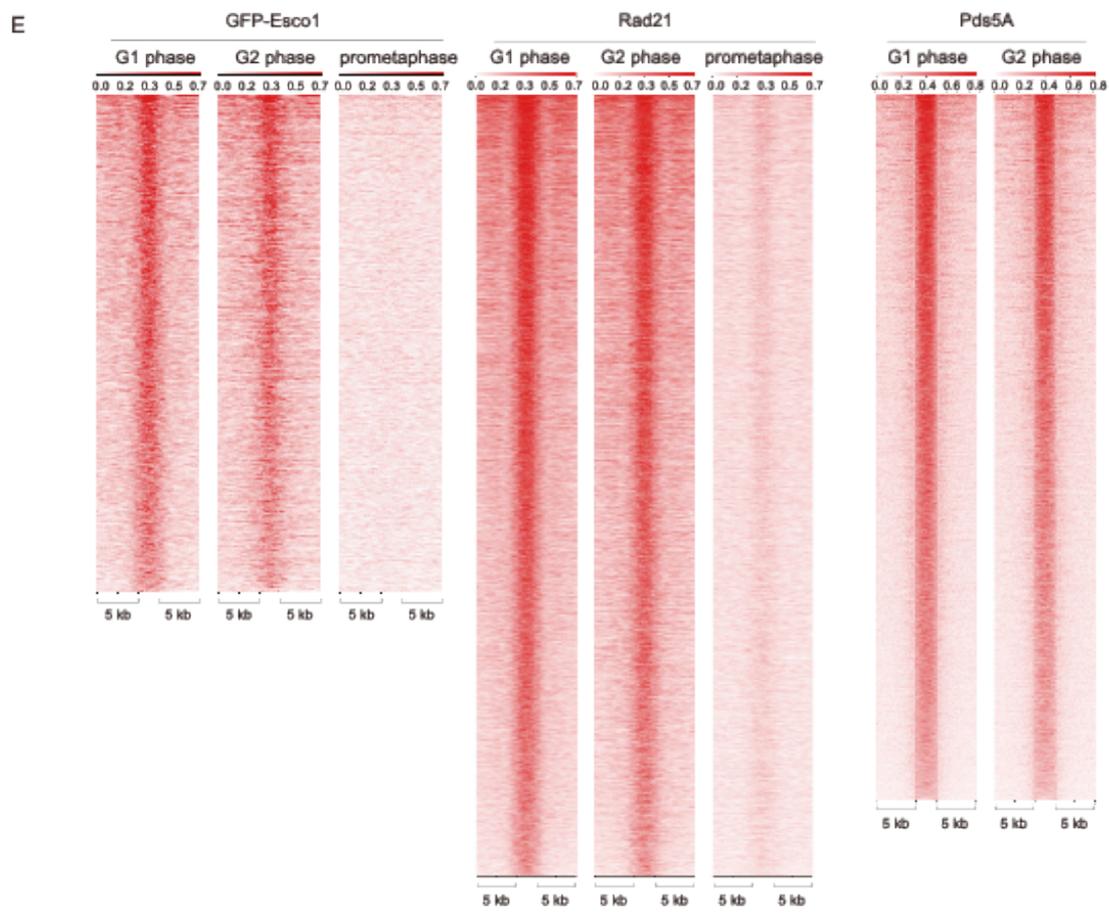


C

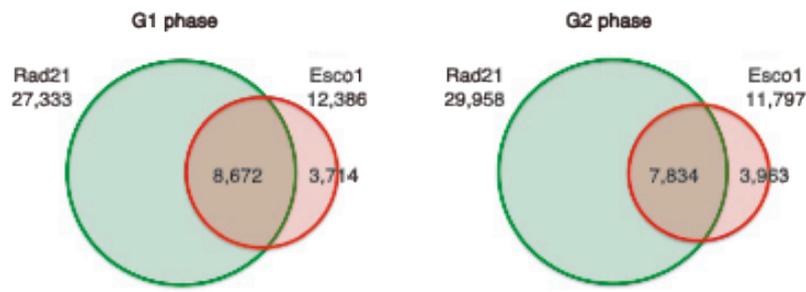


D

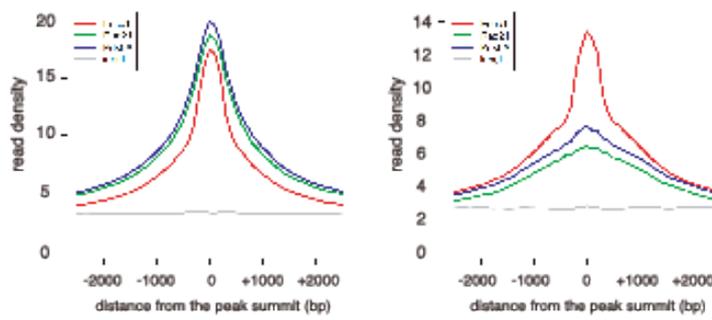




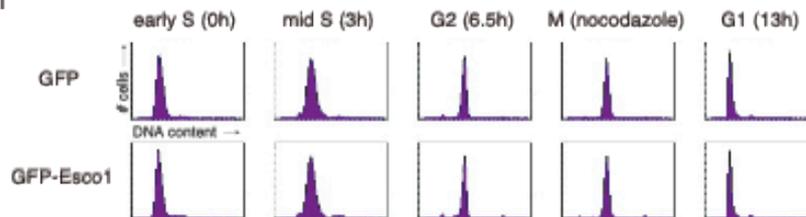
G



H



I



J

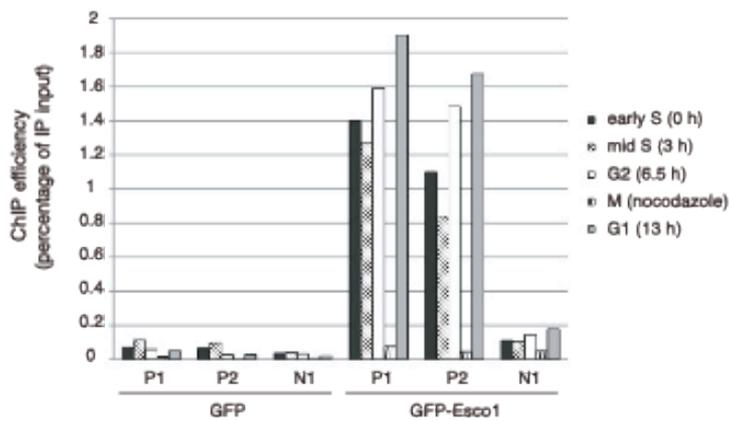


図 9

(A) GFP-Esco1 を安定的に発現する HeLa 細胞株の樹立

樹立した細胞株における GFP-Esco1 の発現をウエスタンブロッティングで解析した。

(B、C) Esco1、Rad21、Pds5A の染色体上における局在の網羅的解析

GFP-Esco1、Pds5A、Rad21 の細胞周期における局在の変動を ChIP-sequencing により解析した。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析結果、または 1 番染色体上の領域(201.2-201.7Mb)でのそれぞれのタンパク質の局在をそれぞれ、(B)、(C)に示す。(C)において、最上図は遺伝子の位置を示し、高さは、各免疫沈降サンプル中におけるそれぞれの領域の DNA 量 (リード数)、つまりはタンパク質の濃縮量を示している。局在領域 (ピーク) は赤色で示す。

(D) Esco1、Rad21、Pds5A の局在領域と遺伝子の位置との相関

それぞれのタンパクの局在箇所を遺伝子上流 5kb 以内(upstream)、下流 5kb 以内(downstream)、遺伝子内部(genic)、もしくは遺伝子間領域(遺伝子から 5kb 以上離れている領域 ; intergenic)に分類分けし、それぞれの割合を示した。ヒトゲノムにおける、それぞれの領域の割合を Background genome として示している。

(E) Esco1、Rad21、Pds5A の局在の細胞周期における変動

G1 期のそれぞれのタンパクの局在ピークを中心として、その 5kb 周辺における細胞周期の局在変動をヒートマップで示した。局在が強いピーク領域をそれぞれ上から並べている。

(F) Esco1、Rad21、Pds5A の局在比較

Esco1 のピーク、およびその周辺 5kb 領域における、Rad21、Pds5A タンパクの濃縮をヒートマップで示した。Esco1 の局在が強い領域を上から順番に並べている。

(G) Esco1、Rad21 のピークの重なり

G1、G2 期における、Esco1、Rad21 の局在部位の重なりをベン図で示した。

(H) Rad21 ピークと重ならない Escal1 ピークにおける、Rad21 の局在量

G1 期の Escal1 のピークのうち、Rad21 ピークと重なったもの、重なっていないものに分類分けし、Escal1 ピークから 2kb の領域における Rad21、Pds5A の局在（平均リード数）を示した。

(I、J) 細胞周期における Escal1 の局在変動の解析

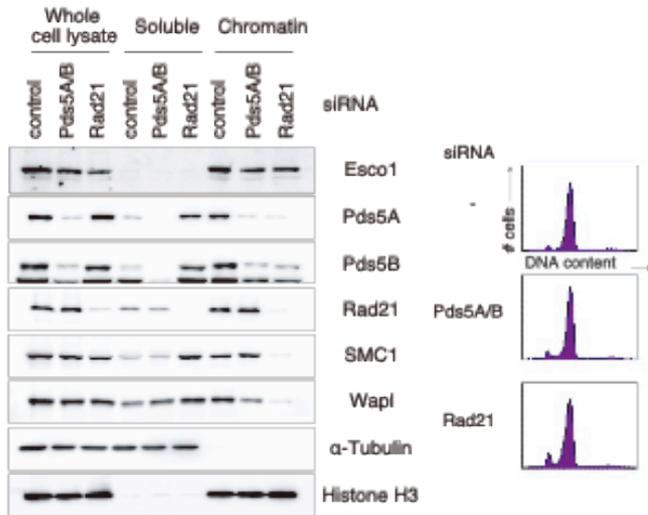
GFP、または GFP-Escal1 を発現する HeLa 細胞をダブルチミジン処理によって、S 期初期(early S)、S 期中期(mid S)、G2 期、M 期、G1 期に同調した。M 期同調には nocodazole を用いた。その後、GFP 抗体を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)し、定量 PCR(qPCR)により、コヒーシン局在部位(P1、P2)、コヒーシン非局在部位(N1)における局在量を解析した。

4-10 **Esco1** のコヒーシオン部位への局在には、**Pds5** が必要である。

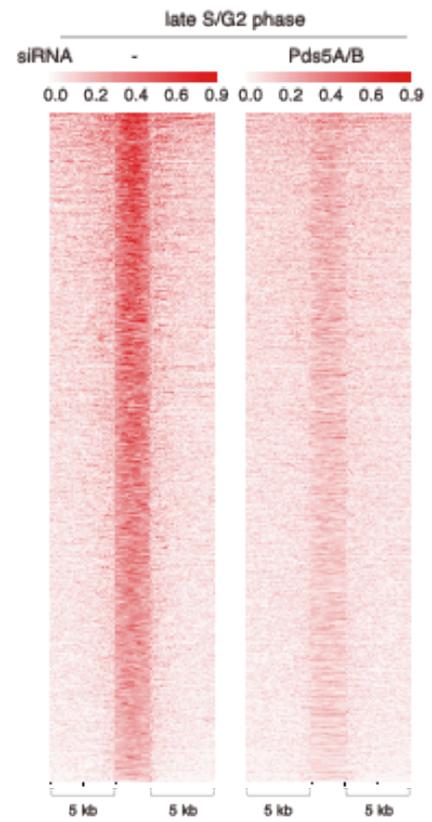
Esco1 は、コヒーシオンをアセチル化するために **Pds5** を必要とすることから、**Esco1** の局在が **Pds5** に依存する可能性が考えられた。その可能性を検証すべく、**Pds5A**、**Pds5B** の両者、または **Rad21** をノックダウンし、クロマチン分画法により、染色体に結合する **Esco1** の量を解析した (図 10A)。**Rad21** をノックダウンすると、先行研究と一致して (Losada et al., 2005)、**Pds5** は可溶性分画に移行した。その際の **Esco1** の動態を解析すると、**Esco1** は依然として、染色体に結合していた。**Pds5** ノックダウンを行っても、同様の結果が得られた。また、**Pds5** と結合できない **Esco1** 変異型の染色体結合を同様にクロマチン分画法で検証したところ、野生型と同じように染色体に結合していた (図 10B)。以上の結果から、**Esco1** のクロマチン結合自体は、**Pds5** に依存しないことが考えられた。この結果は、先行研究における、**Pds5** 結合領域を含まない **Esco1** の N 末端領域断片が十分にクロマチンに結合する、という結果と一致している。

しかしながら、興味深いことに、**Pds5A**、**Pds5B** をノックダウンした条件下で **Esco1** の局在を ChIP-sequencing により網羅的に解析したところ、**Pds5** をノックダウンすることにより、大多数の **Esco1** の局在が大幅に減少した (図 10C、D)。さらに、ChIP-qPCR を用いて、**Esco1** の局在を定量的に解析すると、**Pds5** ノックダウンにより、局在は半分程度に減少していることがわかった (図 10E、F)。**Rad21** ノックダウンによっても、ほぼ同等の効果が観察された。一方、**Pds5** をノックダウンしても、**Rad21** の局在はほぼ変化しなかった。これら結果から、**Pds5** はコヒーシオンの局在自体には、必要でないが、**Esco1** の局在には必要であると考えられた。

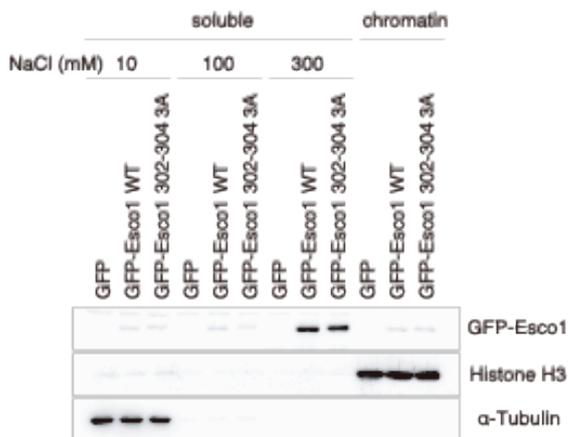
A



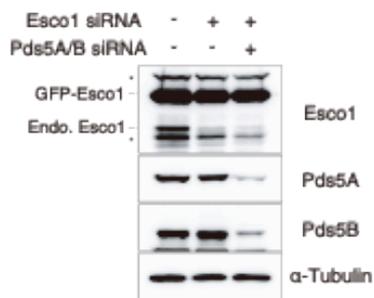
C



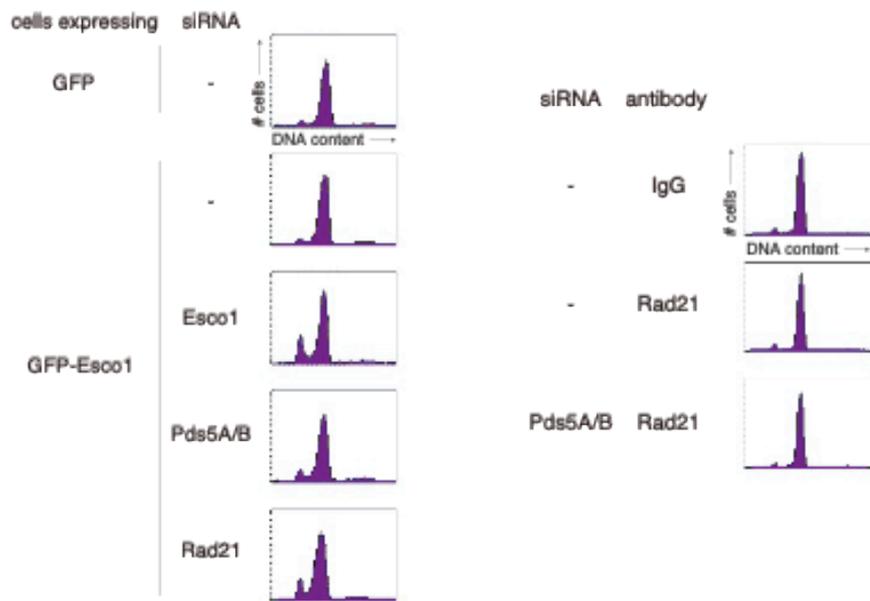
B



D



E



F

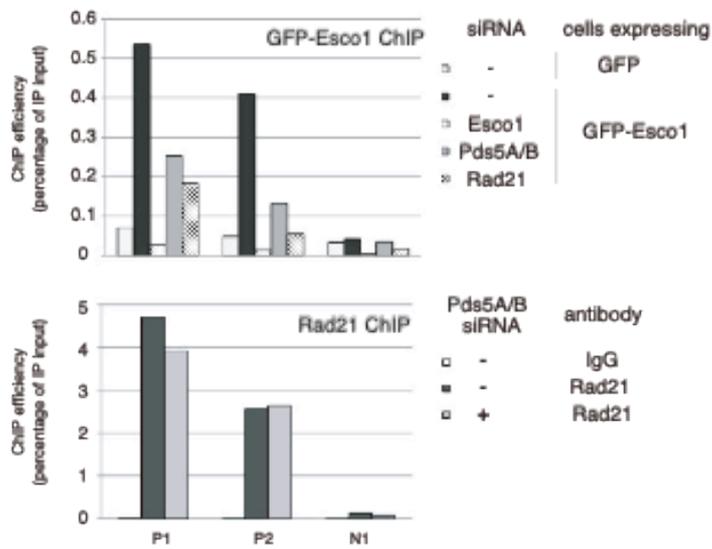


図 1 0

(A) Escol のクロマチン結合の Pds5、Rad21 依存性の検証

Pds5A/B、Rad21 をノックダウンした後、G2 期に同調し、クロマチン分画法により Escol のクロマチン結合を解析した。全細胞抽出液(Whole cell lysate)、可溶性画分(Soluble)、クロマチン画分(Chromatin)中のタンパク質をウエスタンブロッティングにより分析した。

(B) Pds5 と結合できない Escol 変異がクロマチン結合に及ぼす影響

GFP-Escol の野生型、変異型を発現する HeLa 細胞を用意し、10mM 塩化ナトリウムの溶解液で処理した。可溶性画分を回収後、100mM 塩化ナトリウムの溶解液で処理し、さらに可溶性画分を回収後、最後に 300mM の塩化ナトリウム溶解液を添加した。それぞれの塩濃度で抽出されたタンパク質画分と、300mM の塩化ナトリウム溶解液処理後に残った不溶性画分をウエスタンブロッティングに用いた。

(C、D) Pds5 ノックダウンによる Escol 局在の変化の解析

GFP-Escol を発現する HeLa 細胞株において、Pds5 をノックダウンした後、GFP 抗体を用いた ChIP-sequencing によって、GFP-Escol の局在を解析した。ヒートマップは、全 Escol 局在ピークとその周辺 5kb 領域における Pds5 ノックダウンによる Escol 局在変化を示している。GFP-Escol の発現はウエスタンブロッティングで解析し、その結果を(D)に示した。

(E、F) Escol 局在のコヒーシオン依存性の検証

GFP-Escol を発現する HeLa 細胞株において、Pds5、Rad21 をノックダウンした後、GFP 抗体を用いた ChIP-qPCR によって、コヒーシオン局在部位(P1、P2)、コヒーシオン非局在部位(N1)における、G2 期 GFP-Escol の局在を解析した(E 左図、F 上図)。また、Pds5 ノックダウン下における Rad21 の局在を(E 右図、F 下図)に示した。ダブルチミン処理により細胞は同調し、フローサイトメトリーによって細胞周期を解析した(E)。

4-1 1 Esco1 は Pds5 との結合を介して、コヒーシン部位に局在する。

次に、Esco1 と Pds5 の結合が Esco1 の局在に必要なかどうか、解析した。HeLa 細胞において、GFP のみ、GFP-Esco1 野生型、もしくは Pds5 と結合できない変異 GFP-Esco1 を発現させ、コヒーシン局在部位における、それぞれの局在を CHIP-qPCR で解析した。GFP-Esco1 の野生型と変異型の発現量は同程度である一方で(図 1 1 A)、コヒーシン局在部位に存在する GFP-Esco1 変異型の量は、野生型に比べ、大幅に少なかった(図 1 1 B)。これは、Pds5 ノックダウンにより Esco1 の局在が減少することと一致しており、Pds5 との結合に依存して、Esco1 はコヒーシン部位に局在することを示している。

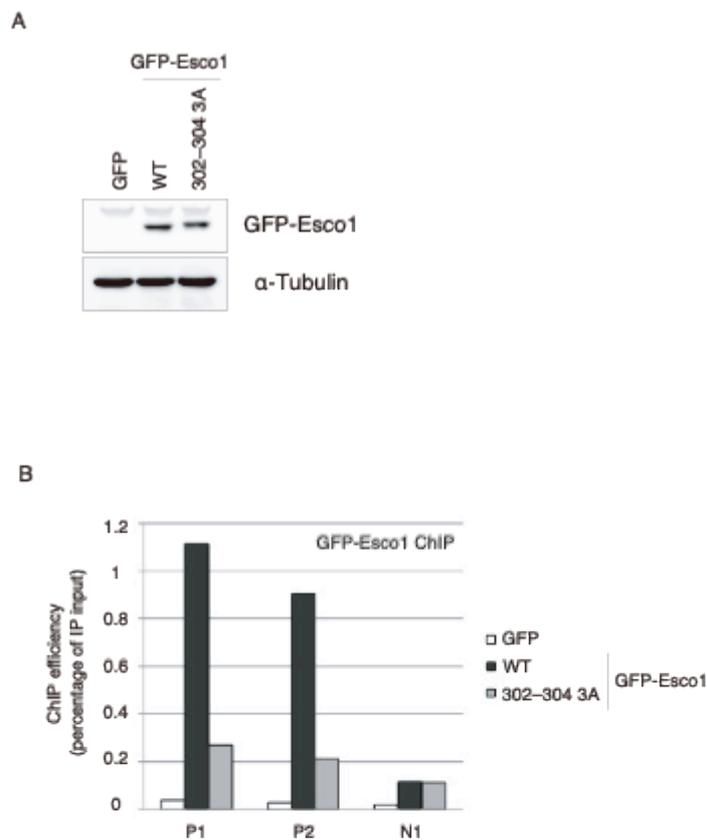


図 1 1

(A、B) Esco1 局在における Pds5 との相互作用の依存性の検証

HeLa 細胞において、GFP、GFP-Esco1 野生型、Pds5 と相互作用できない変異型 Esco1 をそれぞれ発現させた。その発現レベルは、ウエスタンブロッティングで検証した(A)。そして、GFP 抗体を用いて ChIP-qPCR により、それぞれのタンパクの局在を解析した(B)。

4-1 2 Esco1 は分裂期において、Aurora B キナーゼ依存的に Pds5 との結合領域がリン酸化される。

コヒーシンは分裂期になると、Cdk1 や Aurora B キナーゼの制御を受けて、染色体から外される(Nishiyama et al., 2013)。細胞周期を通じて発現している Esco1 は分裂期にリン酸化修飾を受けることが知られているが(Hou and Zou, 2005)、それがどのような意味を持つか、不明であった。そこでまず、Esco1 のリン酸化部位の同定を試みた。HeLa 細胞において、GFP-Esco1 を発現させ、チミジン、もしくはノコダゾールを処理することにより、S 期、分裂期にそれぞれ同調後、GFP 抗体を用いて GFP-Esco1 を精製した (図 1 2 A)。そして、ポリアクリルアミドゲルにより、精製サンプルを分離した。内在 Esco1 は、分裂期に受けるリン酸化修飾に伴って、ポリアクリルアミドゲル中の泳動度が変化することが報告されているが(Hou and Zou, 2005)、GFP-Esco1 も同様の傾向が観察された。質量分析によってリン酸化部位を解析し、分裂期特異的に見られたリン酸化サイトを図 1 2 B に示した。驚くべきことに、Pds5 との相互作用に重要な 302 番目のセリンが分裂期特異的にリン酸化されることがわかった。この結果と一致して、このアミノ酸をアラニンに置換することで、分裂機 Esco1 のポリアクリルアミドゲル中の泳動度が変化することも見いだしている (図 1 2 C)。そこで、302 番目のセリンがリン酸化された Esco1 を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製した。GFP-Esco1 を S 期もしくは分裂期の細胞から精製し、当該抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、当該抗体は、分裂期の GFP-Esco1 のみに反応した (図 1 2 D)。そして、その反応は、302 番目のセリンをアラニンに置換することで阻害された。以上の結果から、当該抗体が GFP-Esco1 中のリン酸化された 302 番目のセリンに反応しており、また、このセリン残基が分裂期にリン酸化されることを確認できた。

次に Esco1 の 302 番目のセリンをリン酸化するキナーゼの同定を試みた。Esco1 の

当該領域は Aurora B キナーゼのコンセンサス配列と合致している。細胞を Plk1、もしくは Aurora B キナーゼの阻害剤で処理し、GFP-Esco1 のリン酸化を解析したところ、Plk1 を阻害しても、GFP-Esco1 のリン酸化はほぼ変化しない一方で、Aurora B を阻害することでリン酸化レベルは劇的に減少した (図 1 2 D)。Aurora B 依存的に GFP-Esco1 はリン酸化されると考えている。また、分裂期の内在 Esco1 に見られるポリアクリルアミドゲル中の泳動度の変化も、Aurora B を阻害することで、抑制されたことから (図 1 2 E)、内在 Esco1 のリン酸化も Aurora B に依存していると考えている。

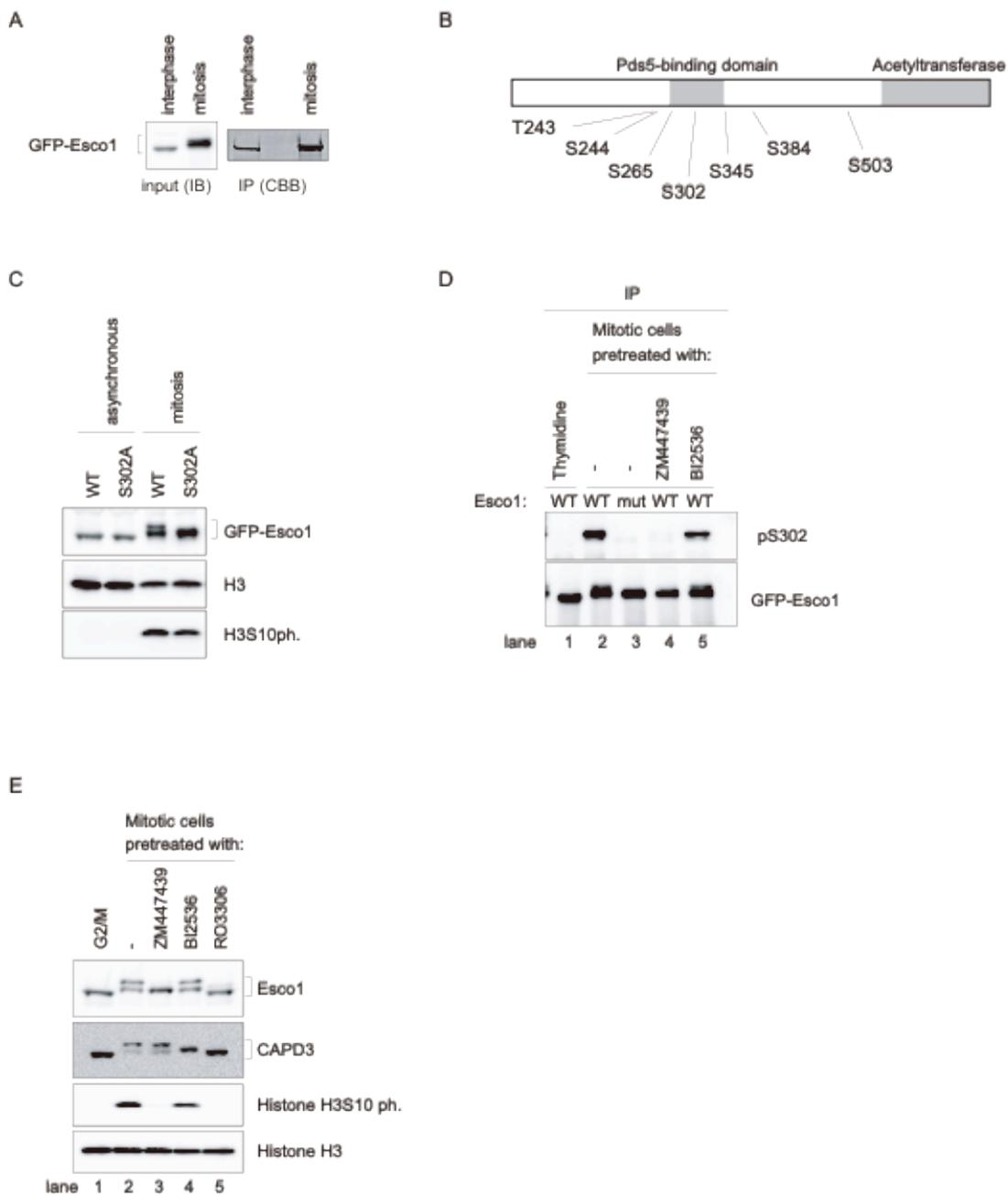


図 1 2

(A) 間期、分裂期の GFP-Esc1 の回収

HeLa 細胞に GFP-Esc1 を発現させ、GFP 抗体を用いて免疫沈降した。input 画分、

IP 画分の GFP-Esco1 をそれぞれウエスタンブロッティング、CBB 染色によって検出した。

(B) 分裂期特異的な Esco1 のリン酸化サイト

免疫沈降により精製した間期、分裂期 GFP-Esco1 の翻訳後修飾を質量解析によって検出した。この実験は独立して2度行っており、2度ともに検出された、分裂期特異的なリン酸化サイトを示している。

(C) 分裂期 Esco1 の 302 番目のセリンにおけるリン酸化が電気泳動度の違いに及ぼす影響

GFP タグの付いた Esco1 野生型、または S302 番目のセリンをアラニンに置換した変異 Esco1(S302A)を HeLa 細胞に発現させ、ウエスタンブロッティングで電気泳動度の違いを解析した。分裂期のマーカーとして、ヒストン H3S10 のリン酸化(H3S10ph.) レベルを示した。

(D) GFP-Esco1 の分裂期におけるリン酸化への分裂期キナーゼの関与の解析

GFP-Esco1 の野生型、もしくは 302 番目のセリン(S302)をアラニンにした変異 Esco1(mut)を発現している HeLa 細胞をチミジン処理、もしくはノコダゾール処理により、S 期、分裂期にそれぞれ同調した。その後、GFP 抗体を用いて、GFP-Esco1 を精製し、S302 のリン酸化を認識する抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、リン酸化レベルを解析した。AuroraB キナーゼ、Plk1 キナーゼを阻害するため、分裂期細胞を ZM447439、BI2536 で処理した。

(E) 内在性 Esco1 の分裂期におけるリン酸化への分裂期キナーゼの関与の解析

細胞を Cdk1 阻害剤 RO3306 もしくは、ノコダゾールで処理することで、細胞を G2/M 期、分裂期にそれぞれ同調した(lane 1、lane2-5)。分裂期に同調した細胞はノコダゾール存在下でさらに、ZM447439、BI2536、RO3306 で処理した。その後、細胞を回収し、ウエスタンブロッティングにおける電気泳動度の違いを計測した。阻害剤の効果を

確かめるため、Aurora B キナーゼ、Plk1 キナーゼの基質であるヒストン H3S10、コンデンシン II サブユニット CAPD3 のリン酸化も解析している。

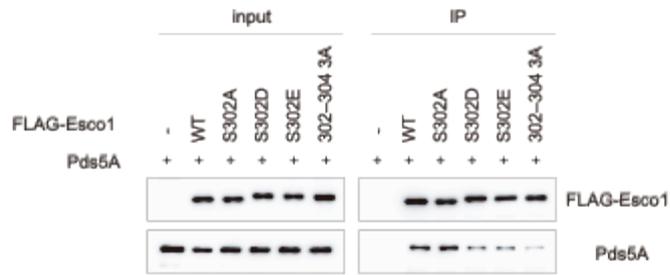
4-13 Esco1 のリン酸化は Pds5 との結合を抑制する。

Esco1 の 302 番目のセリンのリン酸化が Pds5 との結合に影響するかどうか、検証するため、Esco1 の 302 番目のセリンをアスパラギン酸、もしくはグルタミン酸に置換した Esco1 変異型（リン酸化様変異 Esco1）を作製した。昆虫細胞において、Pds5A と同時に、Esco1 野生型、変異型を発現させ、Esco1 を免疫沈降し、共沈する Pds5A の量を解析した。その結果、302 番目のセリンをアスパラギン酸、グルタミン酸のどちらに置換しても、共沈する Pds5 の量は、わずかであるが、減少した（図 1 3 A）。Esco1 はリン酸化されることで、Pds5 との結合が弱まると考えている。一方、アラニンに置換した際に、その変化は見られなかった。

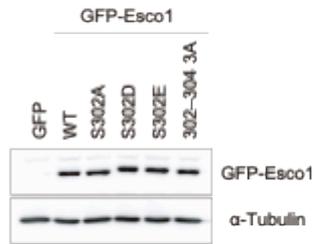
次に、各変異 GFP-Esco1 を発現する HeLa 細胞を用意し、それぞれの局在を ChIP-qPCR で解析した（図 1 3 B、C）。その結果、302 番目のセリンをアラニンに置換することで、局在はわずかに減少した一方で、アスパラギン酸、グルタミン酸への置換は、Esco1 の局在を大きく減少させた。この結果は、Esco1 のリン酸化によって、Pds5 との結合が弱まること、また、Esco1 の局在は Pds5 との結合に依存することと一致している。

以上、本研究によって、Pds5 は Esco1 と物理的に結合し、Esco1 をコヒーシン部位に局在させることがわかった。さらに、分裂期には、Esco1 と Pds5 の結合が Aurora B を介した Esco1 のリン酸化によって抑制されることも見出した。

A



B



C

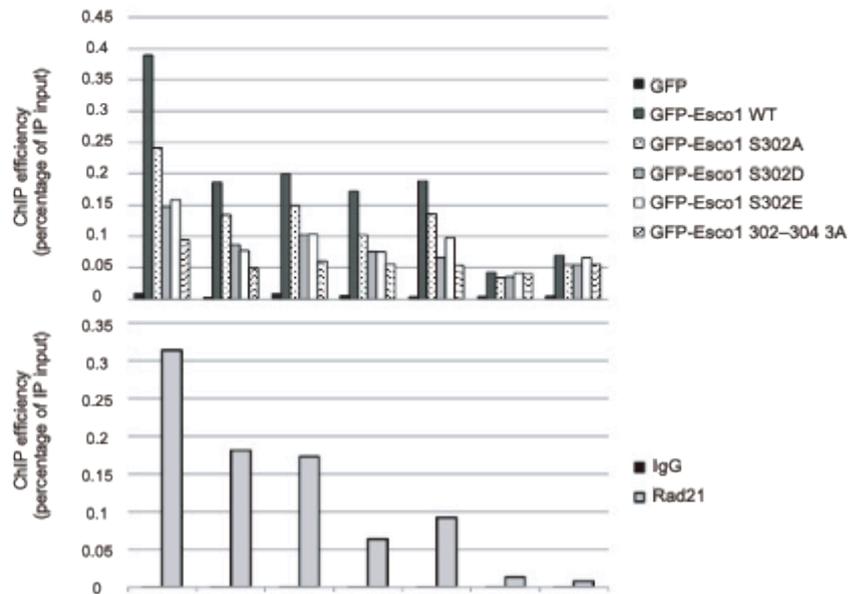


図 1 3

(A) Escol のリン酸化様変異が Pds5 との結合に及ぼす影響

昆虫細胞において、Escol の野生型、もしくは Escol の 302 番目のセリンをアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換した Escol を Pds5A とともに発現させ、Escol を精製した。そして、共沈する Pds5A を解析した。

(B、C) Escol のリン酸化様変異が Escol の局在に及ぼす影響

HeLa 細胞において、GFP-Escol の野生型、もしくは変異体を発現させ、コヒーシン局在部位(P1-P5)、コヒーシン非局在部位(N1、N2)における Escol の量を ChIP-qPCR にて解析した(C)。発現レベルをウエスタンブロッティングで検証している(B)。

4-1-4 Esco2 は N 末端領域を介して、MCM 複合体と物理的に相互作用する。

興味深いことに Pds5 をロックダウンしても、Esco2 の機能は阻害されず、また Esco2 と Pds5 の物理的相互作用も観察されなかった。これら結果から、Esco2 は、Esco1 とは異なる経路で SMC3 をアセチル化している可能性がある。それでは、Esco2 はどのように制御されているのだろうか。近年の研究から、アフリカツメガエル卵抽出液の実験において、Xenopus Esco2 (XEco2) タンパク質は、複製開始前複合体(pre-replication complex)に依存して、保存性の高い 2 つの N 末端領域ドメイン(pre-replication complex dependent chromatin binding motif: PBM_A、PBM_B)を介して、クロマチンに結合することが知られている(Higashi et al., 2012)。複製開始前複合体は、Orc 複合体、MCM 複合体、Cdc6、Cdt1 から構成されており、DNA 複製に必須のタンパク質複合体である。ヒト細胞において、Esco2 は S 期のみ発現していることから、ヒト Esco タンパク質と複製開始前複合体が物理的に相互作用する可能性が考えられた。そこで、セファロースビーズに GFP タンパクのみ、GFP-Esco1 タンパク、または GFP-Esco2 タンパクを結合させておき、それらビーズを S 期の HeLa 細胞抽出液と混合させた(図 1 4 A)。その結果、コヒーシン(Rad21)、PCNA、複製開始前複合体の構成タンパク質である Orc2、Cdc6、Cdt1 と、Esco1、Esco2 の結合は観察されなかった。ところが、興味深いことに、Esco2 は MCM 複合体の構成因子である MCM2、MCM6、MCM7 と共沈した。MCM 複合体は、Esco1 タンパクとはほぼ共沈しないことから、MCM 複合体は Esco2 と選択的に結合していると考えている。

XEco2 のクロマチン結合は、よく保存された、2 つの PBM 領域を介していることから(図 1 4 B)、これら領域がヒト細胞における Esco2、MCM 複合体間の結合に重要な役割を果たしているのかもしれない。XEco2 のクロマチン結合には、PBM_B に比べ、PBM_A が大きく寄与しているという知見を踏まえ(Higashi et al., 2012)、まずはヒト Esco2 内の PBM_A 内の 3 アミノ酸(98 番目から 100 番目までの 3 アミノ酸)をアラ

ニンに置換した (図 1 4 C)。Esco2 変異型タンパクと MCM 複合体との結合能の変化を検証したところ、本アラニン置換によって、MCM 複合体との相互作用が大幅に減少することが判明した (図 1 4 D)。以上の結果から、Esco2 は、PBM_A 領域を介して、MCM 複合体と結合していると考えている。

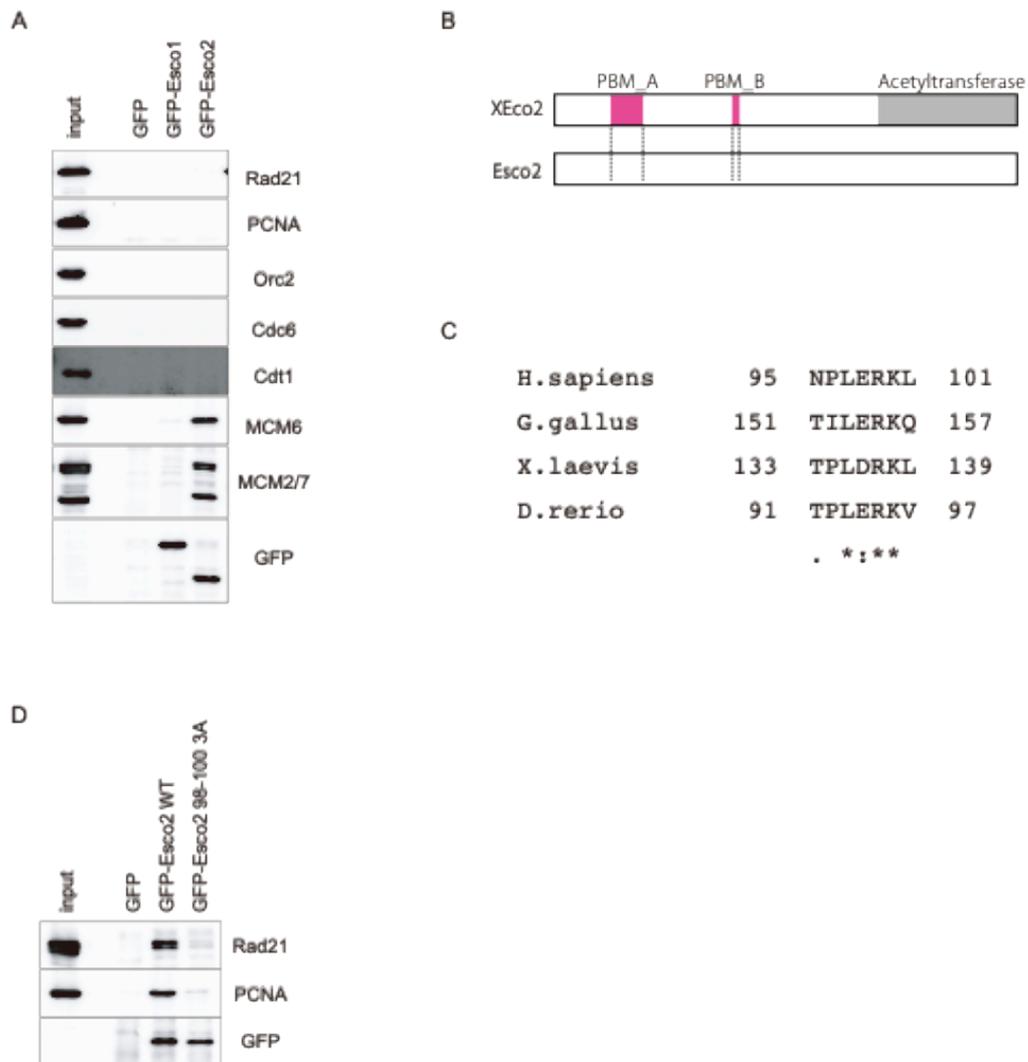


図 1 4

(A) Esco1、Esco2 と複製開始前複合体の構成タンパク質との相互作用の解析

セファロースビーズに GFP 抗体を介して、GFP のみ、GFP-Esco1、GFP-Esco2 を結合させておき、それらビーズを S 期の HeLa 細胞抽出液と混合し、コヒーシン(Rad21)、

PCNA、複製開始前複合体の構成タンパク質との相互作用の有無を調べた。

(B) XEco2、ヒト Esco2 の構造の模式図

(C) Esco2/XEco2 の PBM_A 内のアミノ酸配列の比較

Homo sapiens(ヒト)、*Gallus gallus*(セキショクヤケイ)、*Xenopus laevis*(アフリカツメガエル)、*Danio rerio*(ゼブラフィッシュ)の Esco2/XEco2 の PBM_A ドメイン内のアミノ酸配列を比較した。

(D) Esco2 の PBM_A ドメイン内の変異が MCM 複合体との相互作用に及ぼす影響の解析

Esco2 の 98 番目から 100 番目のアミノ酸をアラニンに置換した Esco2 変異体を作製し、

(A)と同様の方法で、MCM 複合体との相互作用を調べた。

4-15 MCM 複合体は Esco2 タンパク質を安定化する。

次に、Esco2 機能の MCM 複合体への依存性を解析すべく、MCM 6、MCM 7 を合わせてノックダウンし、SMC3 のアセチル化量を解析した (図 1 5 A)。その結果、MCM6/7 をノックダウンしても、SMC3 のアセチル化量は大幅には変化しないことがわかった。MCM6/7 ノックダウンに Esco2 ノックダウンをかけ合わせても、SMC3 アセチル化量はほぼ変わらない一方、Esco1 のノックダウンをかけ合わせたところ、SMC3 アセチル化は加算的に減少した。この結果は、MCM 複合体が Esco2 の機能に必要であることを示しており、Esco2 と MCM 複合体が物理的に相互作用するという結果と一致する。

次に、MCM6/7 ノックダウン条件下における、Esco2 の動態を解析した。その結果、Esco2 のタンパク量が MCM 複合体のノックダウンにより減少することを見出した (図 1 5 B)。一方で、Esco1 タンパク質への影響はわずかであった。この結果は、Esco タンパク質と MCM 複合体の物理的相互作用と関連しており、Esco2 と MCM 複体の物理的相互作用が Esco2 タンパクの安定性に寄与している可能性が考えられた。そこで、HeLa 細胞において、GFP-Esco2 の野生型と、MCM 複合体と結合できない変異型をそれぞれ発現させ、チミジン処理により S 期同調後、全細胞抽出液におけるそれぞれの Esco2 タンパク量をウエスタンブロッティングで解析した (図 1 5 C)。その結果、MCM 複合体と結合できない変異を施すことで、Esco2 タンパク量が減少し、またその減少は、プロテアソーム阻害剤を細胞に処理しておくことでなくなった。以上の結果より、MCM 複合体は、Esco2 の PBM_A 領域と物理的に結合し、その結合を介して、Esco2 タンパク質を安定化していることが示された。

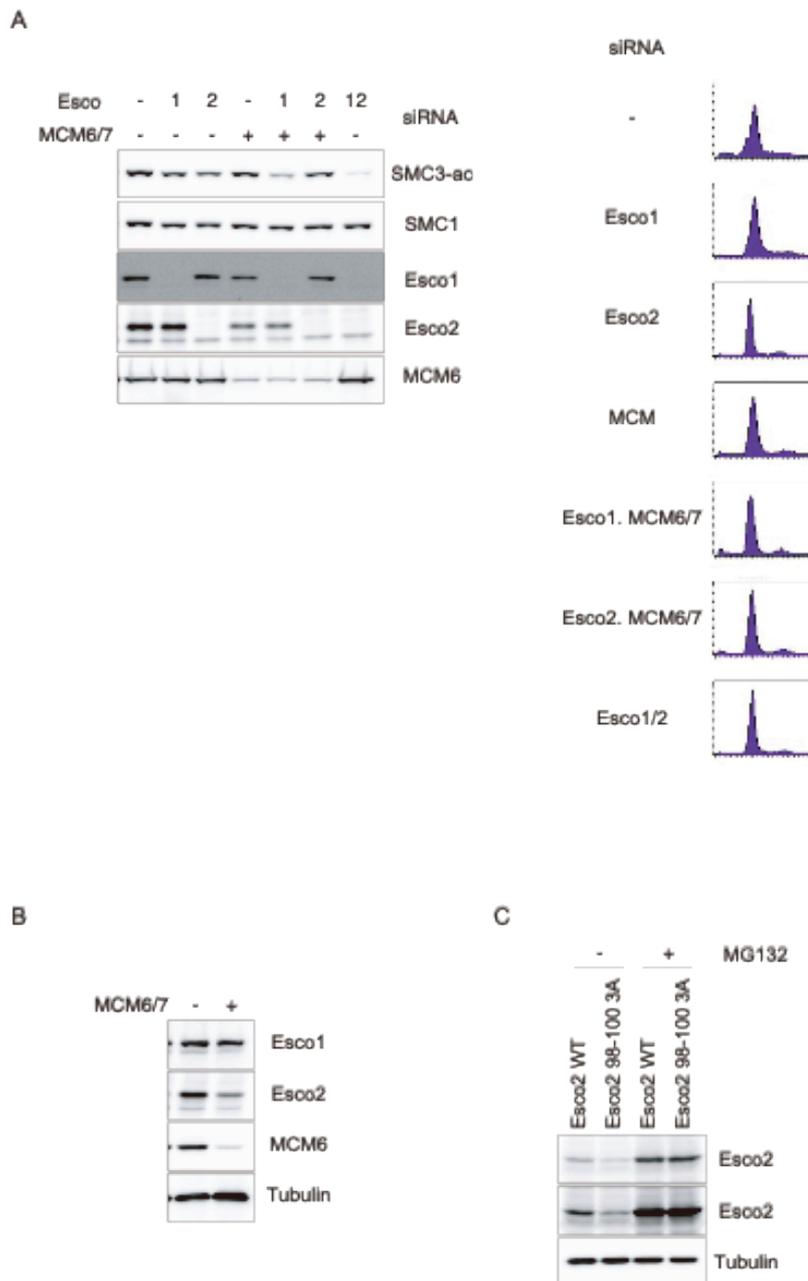


図 1 5

(A) SMC3 アセチル化の MCM 依存性の検証

HeLa 細胞において、Esco1、Esco2、MCM6、MCM7 をノックダウンし、チミジン処理下での SMC3 アセチル化量、または細胞周期を解析した。

(B) MCM 複合体が Esco2 の動態に与える影響の解析

(A)で作製したサンプルを用いて、Esco2 のタンパク量を MCM6/7 ノックダウンの有無で解析した。ローディングコントロールとして Tubulin のタンパク量を調べた。

(C) MCM 複合体と Esco2 の相互作用が Esco2 に与える影響

HeLa 細胞において GFP-Esco2 の野生型、MCM 複合体と相互作用できない変異体を発現させ、そのタンパク量をウエスタンブロッティングによって解析した。細胞は回収する前の 6 時間、プロテアソーム阻害剤である MG-132 で処理した。ローディングコントロールとして Tubulin のタンパク量を調べた。

5、考察

5-1 Esco1 と Pds5 による SMC3 アセチル化制御

現在では、Esco1、Esco2 が SMC3 をアセチル化し、Sororin のクロマチン結合が促進されることで、姉妹染色分体間の接着が確立されると考えられている(Nishiyama et al., 2010)。本研究において、Pds5 をノックダウンすると、Esco1 の機能が選択的に阻害されることを見出した。この結果は、Esco1 と Esco2 が異なる経路で、SMC3 をアセチル化しており、Esco1 は Pds5 と協調していることを示している。この結果と一致して、Pds5 は Esco1 選択的に結合する。さらに Esco1 は、Esco2 と相同性の低い領域を介して Pds5 と結合していることがわかった。そして、Esco1 と Pds5 の結合は、Esco1 のコヒーシン部位への局在、Esco1 による SMC3 アセチル化、さらには姉妹染色分体間接着の形成に必須であり、Pds5 は Esco1 をコヒーシン上に位置させることで SMC3 アセチル化を促進していると考えている。

出芽酵母 Eco1 は、S 期初期では、DNA 複製フォークに局在していることが知られており、DNA 複製フォークとともに染色体上を移動し、姉妹染色体間の接着を順々に確立していると考えられてきた。その一方で、ヒト Esco1 はコヒーシンと共局在しており、またその局在は G1 期と G2 期でほぼ変化しないことから、Esco1 のコヒーシン部位への局在は DNA 複製に依存しないと考えられる。これは、Esco1 が DNA 複製の前後においても、SMC3 をアセチル化することと一致する。

それでは、この DNA 複製前後の SMC3 アセチル化には、どのような機能があるのだろうか。分裂酵母 Eco1 は、DNA 損傷に応答して、確立された姉妹染色分体間の接着を G2 期に補強することが知られていることから(Heidinger-Pauli et al., 2009; Ström et al., 2007; Unal et al., 2007)、Esco1 も、G2 期に SMC3 をアセチル化することによって、同様の機能を担っている可能性がある。または、間期を通じて行われるコヒーシンによる転写制御が Esco1 によって調節されているのかもしれない(Seitan and

Merkenschlager, 2012)。

もし、Esco1 が DNA 複製後に姉妹染色分体間の接着を補強しているならば、コヒーシンが染色体から取り除かれる分裂期には、その機能は抑制される必要があるだろう。実際に、出芽酵母 Esco1 は DNA 複製後に Esco1 リン酸化依存的に分解され、その分解が分裂期の適切な進行に必要であることが報告されている(Lyons and Morgan, 2011; Lyons et al., 2013)。本研究において、ヒト Esco1 の 302 番目のセリンが Aurora B キナーゼ依存的にリン酸化されることで、Pds5 との結合が抑制されることを見出した。この結合は、Esco1 の機能に必須であることから、Aurora B キナーゼは、分裂期に Sororin を不活性化するだけでなく(Nishiyama et al., 2013)、Esco1 のリン酸化を通じて Esco1 機能の抑制にも寄与していることが推測される。そうすると、302 番目のセリンをアラニンに置換した変異型 Esco1 を細胞に発現させると、分裂期においても Esco1 機能が抑制されず、その結果としてコヒーシンが分裂期染色体にとどまり続けることによって、染色体分離が正常に行われなかったことも考えられた。しかしながら、現在までのところ、そのような結果は得られていない。分裂期 Esco1 は 302 番目のセリン以外にもリン酸化を受けることから、それらのリン酸化も分裂期 Esco1 の機能制御に寄与しているのかもしれない。Esco1 による G2 期 SMC3 のアセチル化、さらには、リン酸化を介した分裂期 Esco1 の機能制御の生理的意義の解明が今後の課題である。

5-2 Esco2 と MCM 複合体による SMC3 アセチル化制御

本研究から、Esco2 は、Esco1 に比べ、Sororin のクロマチン結合の安定化に、より寄与していることがわかった。Esco1 もしくは Esco2 のそれぞれをノックダウンすると、SMC3 アセチル化量はほぼ同程度減少するのに対して、クロマチンに安定的に結合する Sororin の量への影響は、Esco2 ノックダウンのほうが大きいことから、Esco2 は、SMC3 アセチル化に加え、また別の経路で、Sororin のクロマチン結合を安定化している可能

性がある。

また、Sororin をノックダウンすると、G2 期における、Esco2 経路の SMC3 アセチル化が減少した。その減少は HDAC8 阻害剤を細胞に処理すると、ほぼ見られなくなったことから、Sororin ノックダウン条件下では、Esco2 にアセチル化されたコヒーシスが HDAC8 によって、即座に脱アセチル化されていることが考えられた。Esco2 による姉妹染色分体間接着形成経路において、SMC3 アセチル化と Sororin のクロマチン結合の安定化を連携させる機構が存在していることも推測される。Sororin のクロマチン結合は、SMC3 アセチル化に加え、DNA 複製にも依存していることから、Esco2 が DNA 複製フォークと密接に関与し、Sororin のクロマチン結合を安定化している可能性がある。

さらに本研究では、MCM 複合体が Esco2 に物理的に結合することを見出している。MCM をノックダウンすると内在性 Esco2 のタンパク量が減少すること、また MCM と結合できない Esco2 変異型がプロテアソーム依存的に分解されることから、Esco2 は MCM と結合することによって安定化されることが考えられる。MCM 複合体は、6 つのサブユニットから構成されているが、どのサブユニットが Esco2 と結合するのか、また、S 期以降に起こる Esco2 の分解機構は MCM との結合制御によって説明できるのか、を解析することが今後は重要となる。合わせて、DNA 複製中において、Esco2 の染色体上での局在がどのように変化するのか、も興味深い課題であると考えている。

6 . 参考論文

Carretero, M., Ruiz-Torres, M., Rodríguez-Corsino, M., Barthelemy, I., and Losada, A. (2013). Pds5B is required for cohesion establishment and Aurora B accumulation at centromeres. *EMBO J.* *32*, 2938–2949.

Chan, K.-L., Gligoris, T., Upcher, W., Kato, Y., Shirahige, K., Nasmyth, K., and Beckouët, F. (2013). Pds5 promotes and protects cohesin acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13020–13025.

Deardorff, M.A., Bando, M., Nakato, R., Watrin, E., Itoh, T., Minamino, M., Saitoh, K., Komata, M., Katou, Y., Clark, D., et al. (2012). HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature* *489*, 313–317.

Giménez-Abián, J.F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Daniel, G., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr. Biol.* *14*, 1187–1193.

Guacci, V., Koshland, D., and Strunnikov, a (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* *91*, 47–57.

Heidinger-Pauli, J.M., Unal, E., and Koshland, D. (2009). Distinct targets of the Eco1 acetyltransferase modulate cohesion in S phase and in response to DNA damage. *Mol. Cell* *34*, 311–321.

Higashi, T.L., Ikeda, M., Tanaka, H., Nakagawa, T., Bando, M., Shirahige, K., Kubota, Y., Takisawa, H., Masukata, H., and Takahashi, T.S. (2012). The prereplication complex recruits XEco2 to chromatin to promote cohesin acetylation in *Xenopus* egg extracts. *Curr. Biol.* *22*, 977–988.

Hou, F., and Zou, H. (2005). Two Human Orthologues of Eco1 / Ctf7 Acetyltransferases Are Both Required for Proper Sister-Chromatid Cohesion. *Mol. Biol. Cell* *16*, 3908–3918.

Lénárt, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J.J., Hoffmann, M., Rettig, W.J., Kraut, N., and Peters, J.-M. (2007). The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr. Biol.* *17*, 304–315.

Losada, A., Yokochi, T., and Hirano, T. (2005). Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.* *118*, 2133–2141.

Lyons, N. a, and Morgan, D.O. (2011). Cdk1-dependent destruction of Eco1 prevents cohesion establishment after S phase. *Mol. Cell* *42*, 378–389.

Lyons, N. a, Fonslow, B.R., Diedrich, J.K., Yates, J.R., and Morgan, D.O. (2013). Sequential primed kinases create a damage-responsive phosphodegron on Eco1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 194–201.

Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* *91*, 35–45.

Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2006). PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol. Cell* *23*, 723–732.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 525–558.

Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A. a., Mechtler, K., et al. (2010). Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. *Cell* *143*, 737–749.

Nishiyama, T., Sykora, M.M., Huis in 't Veld, P.J., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2013). Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Peters, J.-M., and Nishiyama, T. (2012). Sister chromatid cohesion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.

Rolef Ben-Shahar, T., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M., and Uhlmann, F. (2008). Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* *321*, 563–566.

Rowland, B.D., Roig, M.B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouët, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R., et al. (2009). Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol. Cell* *33*, 763–774.

Seitan, V.C., and Merckenschlager, M. (2012). Cohesin and chromatin organisation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *22*, 93–100.

Song, J., Lafont, A., Chen, J., Wu, F.M., Shirahige, K., and Rankin, S. (2012). Cohesin acetylation promotes sister chromatid cohesion only in association with the replication machinery. *J. Biol. Chem.* *287*, 34325–34336.

Ström, L., Karlsson, C., Lindroos, H.B., Wedahl, S., Katou, Y., Shirahige, K., and Sjögren, C. (2007). Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science* *317*, 242–245.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B.H., and Peters, J.-M. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J. Cell Biol.* *151*, 749–762.

Unal, E., Heidinger-Pauli, J.M., and Koshland, D. (2007). DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* *317*, 245–248.

Unal, E., Heidinger-Pauli, J.M., Kim, W., Guacci, V., Onn, I., Gygi, S.P., and Koshland, D.E. (2008). A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. *Science* *321*, 566–569.

Vaur, S., Feytout, A., Vazquez, S., and Javerzat, J.-P. (2012). Pds5 promotes cohesin acetylation and stable cohesin-chromosome interaction. *EMBO Rep.* *13*, 645–652.

Zhang, J., Shi, X., Li, Y., Kim, B.-J., Jia, J., Huang, Z., Yang, T., Fu, X., Jung, S.Y., Wang, Y., et al. (2008). Acetylation of Smc3 by Eco1 is required for S phase sister chromatid cohesion in both human and yeast. *Mol. Cell* *31*, 143–151.

7. 謝辞

約8年間ご指導して頂いた東京大学大学院、白髭克彦教授に心より感謝申し上げます。白髭教授には、研究の面白さ、厳しさを教えて頂きました。また、研究のみならず、様々な場面で私の考えを尊重し、理解を示してくださいました。本当にありがとうございました。

本研究を直接ご指導して下さった坂東優篤助教に心より感謝申し上げます。坂東助教には、本研究に関する全ての実験手法を一から丁寧に教えて頂きました。また、実験結果の解釈や実験プランの構築などにおいて、毎日議論をして頂き、本研究をまとめることができました。

白髭研究室の石橋舞大学院生には、次世代シーケンサーより得られた情報の処理を行って頂きました。また、財団法人癌研究会 実験病理部の広田亨先生、オーストリア分子病理学研究所 Jan-Michael Peters 博士には、実験材料を頂きました。心より感謝申し上げます。

最後に、須谷尚史助教をはじめとする白髭研究室のスタッフ、秘書、技官、学生の皆様に心より感謝申し上げます。この8年間、研究を含む、あらゆる場面で大変お世話になりました。

平成 27 年 8 月 25 日

南野雅