

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17986

研究課題名(和文) 遺伝学とプロテオミクス解析の融合によるコヒーシン制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Investigation of cohesin regulatory network by genetics and proteomics

研究代表者

阿部 拓也 (Abe, Takuya)

首都大学東京・理学研究科・助教

研究者番号：50779999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではコヒーシン複合体及び関連タンパク質の機能とその制御因子の探索を目指し、多重遺伝子欠損細胞を用いた遺伝学、質量分析を用いたプロテオミクスの二つのアプローチを用いた。

- 1) 遺伝学解析；遺伝学的な解析としてはESCO1/ESCO2/WAPL、DDX11/CTF18/WAPLなどの多重欠損細胞を作製し、合成致死やその抑制因子の同定によって、コヒーシン制御因子のネットワークを明らかにした。
- 2) プロテオミクス解析；質量分析装置を用いてコヒーシン結合タンパク質の同定を行ったところ、新規コヒーシン結合タンパク質として、クロマチンリモデラータンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コヒーシンは姉妹染色分体間をつなぐ「のり」の役割を果たすタンパク質複合体であり、複製されたDNAが分裂の前に離れないように互いを接着している。コヒーシンはDNAの構造を変化させることでDNAを介するあらゆる反応(転写、DNA複製、DNA修復、細胞分裂など)に関わっていることから、コヒーシンの制御機構は世界中で盛んに研究されている。しかしながら多くの研究はコヒーシン本体の構造変換に焦点を当てており、20以上存在する「コヒーシン制御因子」の機能解析はあまり進んでいなかった。本研究により、コヒーシン制御因子がどのように関連して機能しているのかを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used genetic and proteomic approaches to understand the mechanism of cohesin regulation. In genetic approach, we established multi-gene knockout cell lines to understand the genetic interaction of cohesin regulators. We found several synthetic lethal interactions and their suppressor mutations. These findings will contribute to understand the cohesin regulatory network. In proteomic approach, we purified cohesin complex by double affinity purification. After MS analysis, we found a chromatin remodeling complex as a new binding partner for cohesin.

研究分野：分子生物学

キーワード：DT40 コヒーシン DNA複製 DNA修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コヒーシンは姉妹染色分体間をつなぐ「のり」の役割を果たすタンパク質複合体であり、複製された DNA が分裂期の前に離れないように互いを接着している。コヒーシンは DNA の構造を変化させることで DNA を介するあらゆる反応 (転写、DNA 複製、DNA 修復、細胞分裂など) に関わっていることから、コヒーシンの制御機構は現在も世界中で盛んに研究されている。しかしながら多くの研究はコヒーシン本体の構造変換に焦点を当てており、「コヒーシン制御因子」の機能解析、及び制御因子同士の機能連関の解析はあまり進んでいない状態であった。コヒーシンの制御因子は少なくとも 20 以上存在するが、これらはお互いに協調または相補しあって機能しており、酵母においてコヒーシン制御因子間で数多くの合成致死の組み合わせが存在することが報告されていた。しかし、酵母の 100 倍以上のサイズの染色体を持つ動物細胞に酵母の知見が外挿できるのか不明であった。また、動物細胞では多重遺伝子欠損細胞の作製が困難であるため、コヒーシン制御因子間で合成致死の組み合わせが存在するのかどうかは長らく確かめられていなかった。

コヒーシン制御因子の欠損は、コヒーシンの欠損と同様にあらゆる DNA 介在反応に影響を与えヒトの遺伝病の原因ともなることから、コヒーシン制御因子は重要な研究対象であり、申請者はこの機能解明に取り組むこととした。

2. 研究の目的

申請者は最近、遺伝子破壊の容易なニワトリ DT40 細胞において系統的遺伝子破壊を行うことにより、「DDX11/ESCO2」「TIPIN/ESCO2」という 2 種類の合成致死の組み合わせを発見し、動物細胞においてもコヒーシン制御因子間で機能相補があることを証明した (図 1)。また、これらの二重欠損細胞において、インナーセントロメア (姉妹動原体の間の領域) の構造異常が合成致死の原因となっている可能性を提唱した。これらの研究結果は、コヒーシン制御因子の基本的性質が酵母から動物細胞まで保存されていることを証明しただけでなく、初めてコヒーシン制御因子間の合成致死の原因まで踏み込んだという点で画期的である。しかし、コヒーシン制御因子の数は多く、それまでに確認した組み合わせ以外にも数多くの機能的な相互作用が存在している可能性が考えられた。そこで本研究ではニワトリ DT40 細胞を用いた遺伝学により、コヒーシン制御因子の機能連関を明らかにすることを目指した。さらに遺伝学のみならずプロテオミクスを用いて新規のコヒーシン制御因子の探索を行った。

コヒーシン制御因子

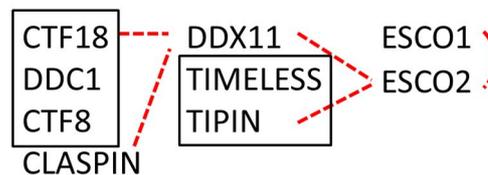


図1, DT40細胞での遺伝学的なコヒーシン制御因子のグルーピング
点線は合成致死の組み合わせを、四角で囲った因子は複合体として存在していることを示す。

3. 研究の方法

本研究では遺伝学とプロテオミクスの両面からのアプローチにより、コヒーシン制御因子の機能的関連を追及した。遺伝学ではニワトリ DT40 細胞を用いた多重遺伝子欠損株の作製によりコヒーシン制御因子同士の合成致死及びその抑制因子を探索することで、合成致死の原因を明らかにした。プロテオミクスでは 2 段階アフィニティー精製によって新規コヒーシン制御因子の探索を行った。

4. 研究成果

1) 遺伝学解析

ESCO1/ESCO2/WAPL の関係性の解明

ESCO1/ESCO2 は酵母 ECO1 のホモログである。ECO1 はコヒーシンをアセチル化し、これは姉妹染色分体間接着に必須のため欠損すると致死となるが、ECO1 と同時に抗コヒーシン因子である WAPL を欠損すると細胞は生存可能となる。この遺伝学的な関係性が高等真核生物でも存在するかどうかを ESCO1/ESCO2/WAPL 多重欠損細胞の作製によって確かめた。その結果、ESCO1/ESCO2 二重欠損細胞は合成致死となったことから、これらの機能が酵母から広く保存されたものであることが明らかになった。この二重欠損細胞に対してさらに WAPL を欠損させた三重欠損細胞では致死性は抑制されず、酵母の ECO1/WAPL の関係性とは異なる結果となった (図 2A)。三重欠損細胞では姉妹染色分体間接着には問題がなかったが、細胞分裂時の染色体の分配が不良化しており、これが致死性の原因と考えられた (図 2B)。また三重欠損細胞ではコヒーシンのクロマチンへの結合が WAPL 単独欠損株よりも強くなっており、高等真核生物の ESCO1/ESCO2 は WAPL に拮抗する作用に加えて、コヒーシンを負に制御する機能があると示唆された。

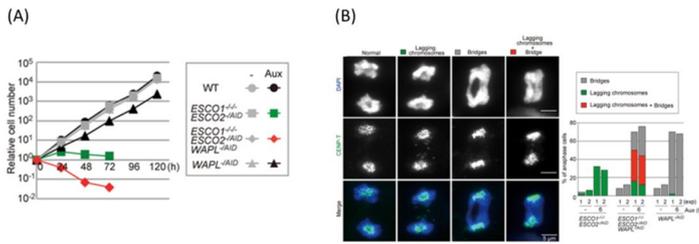


図2,ESCO1/ESCO2/WAPL 三重欠損細胞の解析

A, 各々の細胞株の増殖曲線を示す
B, 分裂期の染色体分配異常の例とそれぞれの異常を定量した結果を示す
Kawasumi et al., Gene Dev 2017より

DDX11/CTF18/WAPL の関係性の解明

申請者の以前の研究で DNA ヘリカーゼ、DDX11 と ESCO2 W615G(点変異)の二重欠損によって細胞が合成致死になることを見出していたが、今回、多重欠損細胞の作製を通じて、PCNA ローダーである CTF18 と DDX11 の二重欠損によっても細胞が合成致死となることを見出した。一方、ESCO2 W615G と CTF18 の二重欠損では姉妹染色分体接着は正常で、細胞も生存可能であったことからこれら二つは姉妹染色分体接着において同じ経路で機能しており、その欠損細胞の姉妹染色分体接着は完全に DDX11 に依存していると考えられる。申請者はさらに DDX11/CTF18 二重欠損細胞の致死性や染色体分配異常が WAPL の欠損によって抑制されることを見出した(図 3A-B)。これは ESCO1/ESCO2/WAPL の関係性とは対照的な結果であり、ESCO1/ESCO2 がコヒーシンの機能を正にも負にも制御するのに対して、DDX11/CTF18 は単純にコヒーシンの機能を正に制御していると考えられた。

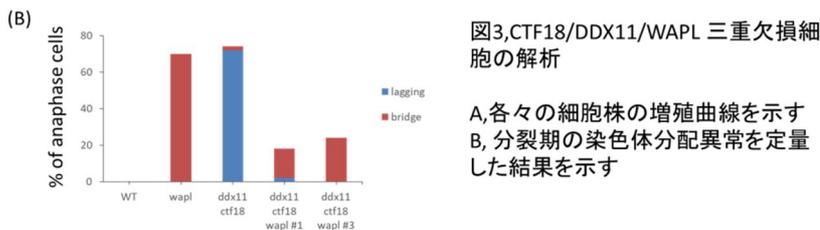
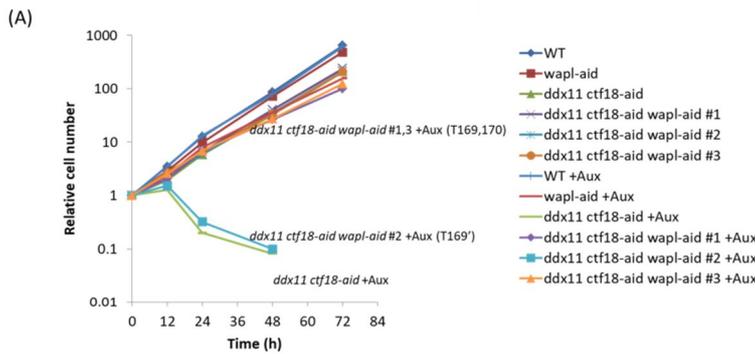


図3,CTF18/DDX11/WAPL 三重欠損細胞の解析

A, 各々の細胞株の増殖曲線を示す
B, 分裂期の染色体分配異常を定量した結果を示す

2) プロテオミクス解析

これまでもコヒーシンを免疫沈降によって精製し、その結合タンパク質を質量分析によって同定する試みは多数行われてきた。本研究においては内因性の RAD21(コヒーシンサブユニット)に2つのエピトープタグを付加し、2段階のアフィニティー精製を行うことで、これまでにない精製度のコヒーシン複合体を得ることができた(図 4A-B)。混雑物も含めて質量分析で同定されたタンパク質はわずか25種類で、その中にこれまでにコヒーシン結合タンパク質として報告されていないクロマチンリモデラーを見出した。DT40細胞でこのクロマチンリモデラーの条件欠損細胞を作製しその染色体を観察したところ、姉妹染色分体接着に異常が観察されたことから、このクロマチンリモデラーは機能的にコヒーシンに結合していると考えられる。

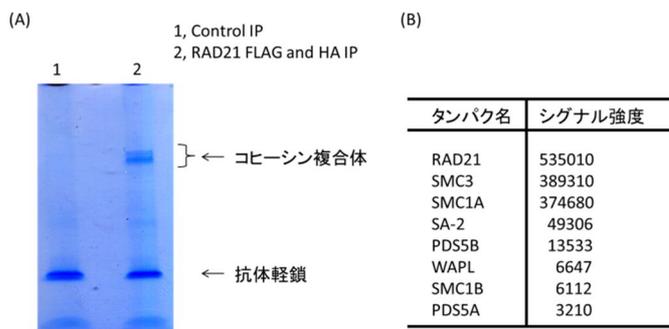


図4, コヒーシン複合体の精製と質量分析

A, FLAGとHA抗体を使った二段階免疫沈降によってコヒーシン複合体を精製した。

B, 質量分析によりAのゲルから抽出した複合体を解析した。ほぼ全てのコヒーシンサブユニットが得られている(クロマチンリモデラーに関しては検出されているが、未発表のため載せていない)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kawasumi R, Abe T, Arakawa H, Garre M, Hirota K, Branzei D. | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 ESC01/2's roles in chromosome structure and interphase chromatin organization. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Genes Dev. | 6. 最初と最後の頁 2136-2150 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.306084.117 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Abe T, Branzei D, Hirota K | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 DNA Damage Tolerance Mechanisms Revealed From the Analysis of Immunoglobulin V Gene Diversification in Avian DT40 Cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Genes (Basel) | 6. 最初と最後の頁 614 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes9120614 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部 拓也 |
| 2. 発表標題 AND-1 fork protection function prevents fork resection and is essential for proliferation |
| 3. 学会等名 The 11th 3R+3C Symposium（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Abe T |
| 2. 発表標題 A method to evaluate the frequency of aneuploidy |
| 3. 学会等名 SMC proteins（国際学会） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部 拓也 |
| 2. 発表標題 複製フォーク構成因子とヒストンバリエーションH2AX、DNA修復因子の遺伝学的関係性の解析 |
| 3. 学会等名 ヒストンバリエーション研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部 拓也、吉本 侑依、廣田 耕志 |
| 2. 発表標題 DNA複製因子TIPINと相同組み換え因子BRCA1の 遺伝学的相互作用の解析 |
| 3. 学会等名 分子生物学会 ワークショップ（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |