

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22770005

研究課題名（和文） 姉妹染色分体間に特異的に接着を形成するためのメカニズム

研究課題名（英文） Mechanism to establish cohesion specifically between sister chromatids

研究代表者

須谷 尚史 (Takashi Sutani)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30401524

研究成果の概要（和文）：

複製により生じた姉妹染色分体対はコヒーシンと呼ばれる複合体により接着され、この接着は引き続く M 期での染色体分配において不可欠な役割を果たすことが知られる。コヒーシンが接着を形成する際には DNA 複製と共役して Eco1 アセチラーゼによりアセチル化されることが重要なことが近年見いだされた。本研究ではコヒーシンのアセチル化が細胞周期でどのように制御されているか、特に Eco1 によるアセチル化はどのような仕組みで DNA 合成と共役しているのか解き明かすことを目的とした。アセチル化コヒーシンを特異的に検出する抗体を用い、以下のことを見いだした。(1) アセチル化コヒーシンは Hos1 によって特異的に脱アセチル化される。この脱アセチル化はコヒーシン複合体を次の細胞周期で再利用するために必要である。(2) DNA 複製と共役したコヒーシンのアセチル化に寄与する因子として、Ctf18-RFC, Ctf4, Chl1 の 3 因子が同定された。これらはいずれも DNA 複製との関連が示唆されている因子である。その後の解析から、これら因子により保障される DNA 複製装置の調和的な動き、特にラギング鎖の円滑な合成がコヒーシンの効率的アセチル化に必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Sister chromatids, products of DNA replication, are held together by cohesin complex, which is vital for faithful chromosome segregation. When the cohesion is established, replication-dependent acetylation of a cohesin subunit Smc3 by Eco1 acetylase plays a critical role. In this study, I investigated how the cohesin acetylation is regulated in the cell cycle and how Eco1's function is coupled with DNA replication. Using an antibody specifically recognizing acetylated Smc3, I found the following. (1) Cohesin is deacetylated specifically by Hos1. This deacetylation is important in recycling cohesin complex for the next cell cycle. (2) Efficient acetylation of cohesin in S phase requires the presence of Ctf18-RFC, Ctf4 and Chl1, all of which are implicated in DNA replication. Subsequent analyses suggested that coordinated replication machinery action, particularly lagging strand synthesis, may play an important role in coupling of cohesin acetylation to DNA replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 基礎生物学 遺伝・ゲノム動態

キーワード： ゲノム構築・再編・維持

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製により生じた姉妹染色分体対はコヒーシと呼ばれる複合体によって離れ離れにならないよう接着されており、この接着は正確な染色体分配に必須な役割を果たしている。コヒーシが接着を形成するためには、その Smc3 サブユニットが Eco1 アセチラーゼによりアセチル化されることが必要なことが近年見いだされた。現在未解明の大きな問題は、このアセチル化反応が細胞内で時空間的にどのように制御されているのかというものである。その仕組みの解明が、姉妹染色分体間にのみ特異的な接着形成を保障するメカニズムの理解につながると考えられる。

2. 研究の目的

コヒーシのアセチル化がどのように制御されているか、特に姉妹染色分体対の創成（すなわち DNA 複製）とアセチル化反応がどのように連携しているかを解き明かす。

3. 研究の方法

出芽酵母を実験材料として、コヒーシアセチル化反応を制御する因子を探索する。まずアセチル化コヒーシを特異的に認識する抗体を作製し、この抗体を用いてアセチル化の細胞周期における挙動が変化している変異株を探索することでアセチル化の制御因子を同定する。また、Eco1 と DNA 複製装置の連携機構を生化学的に探るために、Eco1 と物理的に相互作用する因子の探索も行う。

4. 研究成果

(1) アセチル化コヒーシを認識する抗体の作製

アセチル化 Smc3 (K112Ac K113Ac) を特異的に認識する抗体を作製した。この抗体を用い、出芽酵母 Smc3 のアセチル化は S 期に DNA 合成に依存して起きることを確認した。

(2) Smc3 に対する脱アセチル化酵素の同定、および解析

様々な脱アセチル化酵素の変異体抽出液に対し、1 で作製した抗体でのウェスタンブロットングを行うことでコヒーシに対する脱アセチル化酵素 Hos1 を同定した。その後英国オックスフォード大学、Kim Nasmyth 博士と共同研究を行うことで、Hos1 は M 期後期に役目を終え染色体から解離したコヒーシを特異的に脱アセチル化することを見いだした。この脱アセチル化はコヒーシが次の細胞周期で再利用される際に必須な役

割を担うことがわかった。以上の結果を専門誌 *Molecular Cell* に発表することができた。

(3) 複製と共役した効率的なコヒーシアセチル化に必要な因子の同定

コヒーシアセチル化は DNA 複製と共役して進行する。複製装置内には効率的なコヒーシアセチル化に寄与する因子が含まれると考え、その探索を行った。複製装置およびその関連因子の変異体コレクション中でのアセチル化レベルを検討した結果、Ctf18-RFC, Ctf4 ならびに Chl1 という 3 つの因子が Smc3 が効率よくアセチル化を受けるために必要であることを見いだした。これらはいずれも DNA 複製反応そのものには必須でないが、Ctf4, Chl1 についてはラギング鎖合成の円滑な進行に必要なことが示唆されている。

(4) Eco1 と物理的に相互作用する因子の探索

これまでに Eco1 は複製装置内の PCNA と相互作用することが報告されていた。しかしその相互作用は非常に弱く、通常の免疫沈降法では検出できない程度のものであった。複製装置内には PCNA 以外にも Eco1 と結合する部位が存在する可能性が考えられた。今回大量発現系を活用することで、Eco1 と他の因子の物理的相互作用を感度よく検出できる系を構築した。この系は Eco1-PCNA 間の既知の相互作用を確度高く検出できた。3 で同定された因子群と Eco1 の相互作用について検討したが、結合を見いだすことはできなかった。Ctf18-RFC, Ctf4, Chl1 は Eco1 と直接結合する以外の仕組みで、アセチル化反応に寄与していることが窺えた。一方、このアッセイ系を用いた実験から Eco1 は複製装置中の Mcm 複合体と、PCNA に対するのと同程度の親和性で相互作用しうることが見いだされた。

3、4 の結果から、Eco1 と DNA 複製装置との共役機構はこれまで考えられていたよりも複雑で、多数の因子がそれぞれ異なった仕組みで寄与する複雑なネットワークであることが明らかになってきたといえる。Ctf4, Chl1 の関与は、特にラギング鎖合成の円滑な進行がコヒーシアセチル化反応において重要な役割を果たしている可能性を示唆するものといえる。

(5) Eco1 の姉妹染色分体間接着形成以外における役割

コヒーシによる接着は M 期後期の開始と共に特異的プロテアーゼで切断されることで解消されるが、その際 polo キナーゼによるリン酸化が重要な役割を果たすことが知

られている。今回染色体上のコヒーシには polo キナーゼ (Cdc5) が結合していること、この結合に Eco1 が必要とされることを見いだした。コヒーシンの接着形成時のみならず分解時における制御にも Eco1 が関わっていることが示唆される。これらの結果の一部を先行して、イタリア・ミラノピッコカ大学 Simonetta Piatti 研究室との共同研究の形で J. Cell Biol. 誌に発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Beckouët F, Hu B, Roig MB, Sutani T, Komata M, Uluocak P, Katis VL, Shirahige K, Nasmyth K.

An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion.

Mol. Cell (2010) vol. 39, pg. 689-699

査読あり

② Rossio V, Galati E, Ferrari M, Pelliccioli A, Sutani T, Shirahige K, Lucchini G, Piatti S.

The RSC chromatin-remodeling complex influences mitotic exit and adaptation to the spindle assembly checkpoint by controlling the Cdc14 phosphatase.

J. Cell. Biol. (2010) vol. 191, pp. 981-997

査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① Sutani T, Komata M, Tsuruta T, Tsukumo M, Shirahige K.

Cell cycle regulation of Smc3 acetylation required for sister chromatid cohesion establishment

第 33 回 日本分子生物学会年会 (2010 年 12 月 9 日 兵庫県神戸市)

② 須谷尚史、古俣麻希子、鶴田祥悠、九十九雅理、白髭克彦

姉妹染色分体間の接着確立に必須な Smc3 アセチル化の細胞周期制御

第 28 回 染色体ワークショップ (2011 年 1 月 12 日 石川県加賀市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須谷 尚史 (Takashi Sutani)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30401524