

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 7 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：22770168

研究課題名（和文） 姉妹染色分体間の接着確立と DNA 複製のクロストーク

研究課題名（英文） The crosstalk of DNA replication and sister chromatid cohesion in S phase.

研究代表者 古俣 麻希子（MAKIKO KOMATA）

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任助教

研究者番号：30572911

研究成果の概要（和文）：

アセチル化コヒーシンの動態を解析する為、染色体免疫沈降可能な特異的抗体を獲得することを目指した。結果、酵母、ヒトそれぞれのアセチル化コヒーシンを特異的に認識する抗体を得た。得られた抗体は酵母では、染色体免疫沈降が不可能であったが、ヒトのアセチル化コヒーシン抗体は、免疫沈降が可能であった。この抗体を用い、少数細胞からでも効率よく染色体免疫沈降実験（ChIP-seq 解析）が可能のように、条件検討を重ねた結果、*in vitro* transcription 法（一度 RNA に変換することでバイアスを抑制する方法）を組み合わせるにより、ごく少量の免疫沈降 DNA による ChIP-Seq 解析法を構築し、ヒト染色体上のアセチル化コヒーシンの動態を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We could gain the monoclonal antibody against acetylated cohesin for yeast and human respectively from a few hundreds of candidates. Yeast antibody did not work for ChIP(Chromatin immunoprecipitation) but human antibody could. We have developed the method to carry out ChIP-seq from reduced number of cells (around 10,000 cells), and use this antibody to detect dynamics of Cohesin acetylation in human.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
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：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体構築・機能・分配

1. 研究開始当初の背景

生命の存続にはゲノム情報の正確な複製と、倍加した遺伝情報の娘細胞への均等な分配が不可欠である。複製により生じた姉妹染色分体の間にはコヒーシン複合体による接着が確立形成されており、この接着が正確な染色体分配に必須なことは知られている。すなわち、DNA 合成期には DNA 複製とコヒーシ

ンによる接着が平行して進行していることになる。この両者の研究はそれぞれが世界中で大いに研究されてきたが、細胞周期の同時期に起こる両者間の連携をグローバルな視点から解析されることは少なく、新たな研究の展開が要求されていた。

2. 研究の目的

本申請では、姉妹染色分体間の接着に必須であるコヒーシンのアセチル化に焦点を当て、(1)コヒーシンのアセチル化はDNA複製と共役して起きているのか、(2)コヒーシンのアセチル化と協調的に機能する複製因子の同定、および機能解析、(3)コヒーシンによる複製ストレスを感知する因子の探索を目的に、ゲノム学的手法(ChIP-Seq法)を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

コヒーシンのアセチル化を特異的に認識できる抗体を作製する。この抗体を用いて、DNA複製期におけるアセチル化コヒーシンの染色体動態を体系的に理解するために、ChIP-Seq解析を行う。これと平行して複製因子の欠損株を作製し、コヒーシンのアセチル化が減少するような因子の同定を行う。

4. 研究成果

コヒーシンのアセチル化部位を抗原とするマウスモノクローナル抗体のスクリーニングにより、コヒーシンのアセチル化のみを特異的に認識する酵母、ヒトに対する抗体をそれぞれ得た。酵母のアセチル化抗体は、タンパク質検出においては非特異的バンドのない唯一無二の抗体であったが、種々の条件検討を重ねても免疫沈降は不可能であった。一方、ヒトのアセチル化抗体は免疫沈降率が非常に低いもののコヒーシンのアセチル化のみを免疫沈降することに成功した。

当初、本研究を開始した時点では、出芽酵母を用いたコヒーシンのアセチル化の動態解析とDNA複製との連携を軸に研究を進める予定であったが、酵母アセチル化抗体による免疫沈降が不可能であったため、ヒト細胞を用いてコヒーシンのアセチル化のタンパク結合プロファイルをChIP-Seq法により解析することにした。

免疫沈降DNA(ChIPed DNA)をシークエンスで泳動するには、ChIPed DNAの断片にアダプターを付加し、ライブラリを作製する必要がある。通常、免疫沈降されたDNAは数十ngが最低限度とされている。今回、アセチル化コヒーシンのChIPed DNAは最低限度を大きく下回るDNA量であり、通常の増幅法ではほとんど有効なデータを得ることができなかった。そこで、ごく少量のChIPed DNAの増幅方法の検討を行った。

はじめにChIPed DNAを鋳型にしてランダムPCR増幅法を試みたが、ランダムPCR増幅法は増え易い、あるいは増えにくい等の増幅バイアスがかかってしまい、特に非特異的な繰り返し配列を多く含むヒト細胞を用いた免疫沈降産物の増幅には不向きであった。そこで、非特異的な繰り返し配列の増幅やプライマー自身の増幅を極力抑えるために、T7

RNAポリメラーゼを使用するin vitro transcription (IVT)増幅法を試みた。ChIPed DNAを鋳型とし、大量かつ正確に一本鎖RNAを合成した後に増幅する方法であり、最もバイアスがかかりにくい方法である。これにより、ごく少量のアセチル化コヒーシンのタンパク結合プロファイルを得ることができた。

この増幅法が、近年創薬、診断等への応用で重要視されている微量組織、あるいは微量細胞での免疫沈降解析に有効であると考え、通常の100分の1スケールである10000個のHeLa細胞を用い、メチル化ヒストン抗体により免疫沈降を行った。今回構築した増幅法に加え、少量DNA断片化の効率を上げるため、模倣HeLa DNAとしてバクテリオファージλ DNAを加えた。免疫沈降後、λ DNAはIP分画には含まれず、WCE分画で混入したものについてはシークエンス後の解析でλ DNAのみ排除することが可能である。その結果、10000細胞においても十分なS/N比をもつタンパク質プロファイルを得ることができた。IVT法によるChIPed DNAの増幅は小スケールにおける微量サンプルの免疫沈降法として最適条件の一つであると言える。今後は、ヒト、マウスといった高等真核生物のコヒーシンのアセチル化が複製進行とどのように共役しているのかに焦点を当て、ChIP-Seq法による解析を進める予定である。



図5; 少数細胞からのChIP-SeqによるH3K79me結合領域

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. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange Syndrome affect the cohesin acetylation cycle
Matthew A. Deardorff *et al.*, *nature in press* 査読有
2. An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid

cohesion.

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

Mol Cell. 2010 Sep 10;39(5):689-99.

査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

古俣 麻希子、**Genome wide analyses of fertilization process**、第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古俣 麻希子 (KOMATA MAKIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任助教

研究者番号：30572911