

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25711002

研究課題名(和文)細胞周期依存的なコヒーシン一分子ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Understanding of cohesin dynamics during cell cycle at single molecule resolution

研究代表者

西山 朋子(Nishiyama, Tomoko)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90615535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円

研究成果の概要(和文)：コヒーシン複合体は姉妹染色分体間接着に必須の因子であり、そのダイナミクスは接着の確立や解除といったステップと密接に関わっているが、コヒーシンダイナミクスの一分子レベルでの理解が欠如していた。本研究では、DNA上のコヒーシンを一分子レベルで観察する系を確立し、その細胞周期の進行に応じた挙動を明らかにするとともに、そのダイナミクスを制御するメカニズムの解明を行った。さらにコヒーシンダイナミクスを制御するこれらの機構が進化の過程でどの程度保存されているのかという点についても考察できる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Cohesin plays a crucial role in sister chromatid cohesion and gene expression. The dynamic association of cohesin with chromatin is essential for these functions. However, the exact nature of cohesin dynamics remains unclear. In this study I evaluated the dynamics of individual cohesin molecules on DNA and found that the cohesin possesses an intrinsic ability to traverse DNA in an ATPase-dependent manner. Translocation ability is suppressed in the presence of Wapl-Pds5 and Sororin; this suppression is alleviated by the acetylation of cohesin and the action of mitotic kinases. In *Xenopus* egg extracts, cohesin is translocated on DNA in an ATPase- and Smc3 acetylation-dependent manner. Cohesin movement changes to unidirectional when cohesin faces DNA replication; otherwise, it is incorporated into replicating DNA. This study provides insight into the nature of cell cycle-dependent changes of cohesin dynamics, and also evolutionarily conserved mechanisms to regulate cohesin dynamics.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：姉妹染色分体間接着

1. 研究開始当初の背景

分裂期における姉妹染色分体とその均等な分配が19世紀末にはじめて観察されて以来、染色体の均等分配が娘細胞への遺伝情報の継承に決定的に重要であることが明らかにされてきたが、染色体を均等に分配するために不可欠な姉妹染色分体間接着を担う分子、すなわちコヒーシン複合体が出芽酵母において発見されたのは20年ほど前のことである。コヒーシンの発見以来、出芽酵母における遺伝学を中心に、急速に接着因子の同定が進むと同時に、アフリカツメガエル卵における生化学的解析、電子顕微鏡観察などから、コヒーシンがリング状の構造をしたタンパク質複合体であること、このリング構造が2本の姉妹染色分体を繋ぎ止めるのに重要であり、分裂中期/後期移行時にリングが切断されることで姉妹染色分体間の接着が解消されることなどが明らかになっていった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、姉妹染色分体間接着を担うコヒーシンのダイナミクスを一分子レベルで理解することである。コヒーシン複合体は、そのDNAとの結合性が細胞周期の進行に伴って多段階に変化し、それぞれが接着の確立や解除といったステップと密接に関わっている。しかしながらコヒーシンはこれまで分子集団としてしか観察・解析されておらず、コヒーシン一分子のDNA上での挙動は明らかになっていない。本研究では、DNA上のコヒーシンを一分子レベルで観察する系を確立し、その細胞周期の進行に応じた挙動を明らかにするとともに、そのダイナミクスを制御するメカニズムを明らかにすることで、姉妹染色分体間接着/解離機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究ではコヒーシン複合体をクロマチン化したDNAに生理的な条件下で結合させ、その挙動を全反射顕微鏡で観察する。さらに細胞周期の進行に応じた変化をリアルタイムで観察するために、DNAのクロマチン化やコヒーシンのローディングのほか、細胞周期の様々なイベントを *in vitro* で自在に制御できるアフリカツメガエル卵抽出液を用いた。この系において、コヒーシンがDNAに結合するG1期、接着が確立するS期、多くのコヒーシンが解離する分裂前/中期に相当する環境下で、コヒーシンの挙動を観察した。コヒーシン一分子観察系の確立と並行して、接着解離の分子メカニズムを明らかにするため、ヒト体細胞・アフリカツメガエル卵におけるSororin不活性化機構の解明に取り組んだ。

4. 研究成果

1. コヒーシンはDNA上において一次元自由拡散運動を示す

はじめに、コヒーシンが2本鎖DNA上でどのような挙動を示すかを観察した。コヒーシンローディング因子であるScc2-Scc4複合体依存的にDNAにトポロジカルに結合させたコヒーシンは、DNA上をランダムに移動し、その動きは自由拡散運動であると判定された。コヒーシンはSmc1およびSmc3サブユニットのヘッドドメインにATP加水分解活性を持つが、ATP非存在下においても同様の運動を示したことは、この動きが拡散運動であることを支持している。しかしながらATP非加水分解型アナログであるAMP-PCP存在下でコヒーシンの動きが顕著に抑制された。AMP-PCPはSmc1-Smc3ヘッドドメイン同士の解離を抑制するため、コヒーシンリングが物理的に閉じた状態になることが、コヒーシンの拡散運動に対して阻害的に働いている可能性が示唆された。

2. Smc3のアセチル化はコヒーシンの運動を促進し、Wapl-Pds5は抑制する

つぎに、コヒーシンの動きに対するコヒーシン修飾因子および結合因子の作用を検討した。コヒーシンSmc3サブユニットのヘッドドメインには、真核生物の間で広く保存されたリシン残基が存在し、このリシン残基のアセチル化は、接着の確立に必須であることが知られている(文献1)。そこで、この保存されたアセチル化がコヒーシンの動きにどのような影響を及ぼすのかを解析したところ、アセチル化酵素Esco1によってアセチル化させたコヒーシン複合体は、非アセチル化コヒーシンにくらべて拡散係数が増加することが明らかになった。一方、コヒーシンを染色体から解離させるのに必要なコヒーシン結合因子Wapl-Pds5は、拡散係数を減少させた。興味深いことに、Wapl-Pds5によって抑制されたコヒーシンの動きは、アセチル化によって回復した(図1)。このことは、コヒーシンのアセチル化がWapl-Pds5の作用に拮抗することでコヒーシンの運動を促進する可能性を示唆している。アセチル化がどのようにしてコヒーシンの拡散係数を上昇させるのかは未だに不明であるが、AMP-PCPやWaplによってコヒーシンの動きが抑制されることを考慮すると、アセチル化がコヒーシンリングの内径を物理的に広げる、あるいはDNAとの相互作用を減弱させることで、動きを加速している可能性が考えられる。

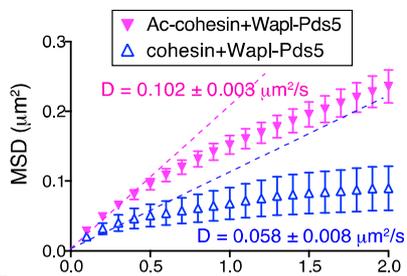


図 1
アセチル化は Wapl-Pds5 による運動抑制作用に対して拮抗する働きをもつ

3. Smc3 のアセチル化はクロマチン上におけるコヒーシンの運動に必要である

ここまで見てきたように、緩衝液中において解析したクロマチン化されていない naked DNA 上でのコヒーシンの運動は、細胞核内クロマチン上でも実際に観察されるのだろうか。この点を明らかにするため、アフリカツメガエル卵抽出液を用い、DNA をクロマチン化させたときのコヒーシンの動きを観察した。卵抽出液中でクロマチン化された DNA は、ヒストンを取り込み、ヌクレオソームを形成した。ここに、精製して蛍光標識したツメガエルコヒーシン複合体を添加したところ、内在性コヒーシンと同様、複製前複合体 (pre-RC) 依存的に蛍光標識コヒーシンが DNA 上に結合した。このコヒーシンを観察したところ、緩衝液中で観察したのと同様、DNA 上を移動していく様子が観察された。興味深いことに、コヒーシンの運動とヌクレオソーム形成位置を比較したところ、ヌクレオソーム密度の高い場所でコヒーシンが停滞していることがわかった。このことは、35 nm 程度と考えられていたコヒーシンの内径が、実際はさらに小さく、直径 10 nm 程度と考えられるヌクレオソームですら運動の障害になり得ることを示唆している。

次にアセチル化の影響を検討するため、ツメガエル卵抽出液中でコヒーシンのアセチル化に必要であることが知られている XEco2 を卵抽出液から免疫除去し、コヒーシンのクロマチン上での動きを観察した。その結果、コヒーシンの動きは XEco2 の除去により顕著に抑制され、human Escp1 を add-back した卵抽出液中ではアセチル化が回復すると同時にコヒーシンの運動も回復した。このことは、細胞内においてもアセチル化がコヒーシンのクロマチン上での運動に必要である可能性を強く示唆している。

4. DNA 複製中におけるコヒーシンの動態解析

卵抽出液中のコヒーシンの動きの意義を明らかにするため、次に、DNA 複製中におけるコヒーシンの動きを観察した。ツメガエル卵抽出液では、大量の精子核 DNA で核を形成させ、これを回収することで、核質成分を濃縮させた核質抽出液 (Nucleoplasmic

extract: NPE) を得ることができる。この NPE を一分子観察系に導入することで、カバーガラス上の DNA を複製させることができる。さらに DNA 複製フォークに局在する因子 Fen1 を蛍光標識することで、DNA 複製の進行をリアルタイムで可視化することができ、我々は、この系を用いて、DNA 複製中のコヒーシンの動きを観察することに成功した。その結果、コヒーシンの動きは、1) DNA 複製の進行に伴って移動していくもの、2) コヒーシンが動かないために DNA 複製が止まってしまうもの、3) 複製された DNA に取り込まれたもの、4) DNA 複製との衝突により DNA から外されたもの、に分類できることが分かった。この結果は、コヒーシンがクロマチン上で移動できる状態にあることが、DNA とトポロジカルに結合した状態のコヒーシンと DNA 複製との衝突回避に極めて重要である可能性を示唆している。一方で接着という重要な機能を発揮するためには、DNA 複製後にコヒーシンが接着を維持している必要があり、3) で見られたように DNA 複製の進行を許可する特別な仕組みが必要である。この分子メカニズムは今のところ不明であり、今後の更なる解析が必要である。

5. Sororin 不活性化機構の解明

本研究では一分子解析と並行して、細胞内における Sororin の分裂期不活性化機構の解明にも取り組んだ。Sororin はコヒーシン不安定化因子である Wapl-Pds5 と一時的に拮抗することで、S 期から G2 期における接着を維持していると考えられている。一方で、分裂期においてその拮抗作用がどのようなメカニズムで解除されるのかは明らかになっていない。本研究では、Sororin が分裂期特異的にリン酸化修飾を受けることに着目し、その意義を探った。その結果、Sororin は分裂期キナーゼ Cdk1 および Aurora B 依存的にリン酸化を受け、このリン酸化が Sororin を Wapl-Pds5 複合体から解離させ、拮抗作用を解除していることが明らかになった。さらにコヒーシン複合体自体の Plk1 キナーゼによるリン酸化と相乗的に働くことで、分裂期染色体上のコヒーシンが不安定化され、接着が解離することも明らかになった。このように、Wapl, Sororin, Pds5 の三者が細胞周期を通じてお互いの拮抗関係のバランスを変化させながら、接着を確立・解除している接着システムの存在が明らかになった。

6. 接着確立因子 Sororin の機能は無脊椎動物において保存されている

本研究ではさらに、コヒーシンのダイナミクスを制御するコヒーシン結合因子や修飾因子の進化的保存性にも着目した。接着解離に必須の Wapl, Pds5 や、アセチル化酵素 Escp1/2 は、真核生物の間で広く保存されて

いることが明らかになっていたにもかかわらず、接着確立に必須のコヒーシン結合因子 Sororin は、これまで脊椎動物においてしか同定・報告されていなかった。我々は Sororin の無脊椎動物におけるオーソログと目されるショウジョウバエのクロマチン結合因子 Dmt を、無脊椎動物ではじめて同定し、本研究では、そのショウジョウバエ S2 細胞における機能の解析を行った。その結果、Dmt は脊椎動物 Sororin と同様に、ショウジョウバエにおいても接着確立機能に必須であることが明らかになった。この結果は、本研究で明らかにした種々のコヒーシン結合因子・修飾因子によるコヒーシンダイナミクスの制御機構が、進化的に保存されている可能性を強く示唆するものである。

(参考文献)

- 1) Peters JM, Nishiyama T. Sister chromatid cohesion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(11). doi: 10.1101/cshperspect.a011130. PubMed PMID: 23043155.
- 2) Ocampo-Hafalla M, Munoz S, Samora CP, Uhlmann F. Evidence for cohesin sliding along budding yeast chromosomes. *Open Biol.* 2016;6(6). doi: 10.1098/rsob.150178. PubMed PMID: 27278645.
- 3) Davidson IF, Goetz D, Zaczek MP, Molodtsov MI, Huis In 't Veld PJ, Weissmann F, et al. Rapid movement and transcriptional re-localization of human cohesin on DNA. *EMBO J.* 2016;35(24):2671-85. doi: 10.15252/embj.201695402. PubMed PMID: 27799150.
- 4) Busslinger GA, Stocsits RR, van der Lelij P, Axelsson E, Tedeschi A, Galjart N, et al. Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature.* 2017;544(7651):503-7. doi: 10.1038/nature22063. PubMed PMID: 28424523.

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 4 件)

- 1) Yamada T, Tahara E, Kanke M, Kuwata K, Nishiyama T. Drosophila Dalmatian combines sororin and shugoshin roles in establishment and protection of cohesion. *The EMBO Journal* 36, 1513-1527 (2017). 査読有り
- 2) Kanke M, Tahara E, Huis in't Veld PJ, Nishiyama T. Cohesin acetylation and Wapl-Pds5 oppositely regulate translocation of cohesin along DNA. *The EMBO Journal* 35, 2686-2698 (2016). 査読有り

3) Nishiyama T, Sykora MM, Huis In 't Veld PJ, Mechtler K, Peters JM. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 13404-9 (2013). 査読有り

4) Tedeschi A, Wutz G, Huet S, Jaritz M, Wuensche A, Schirghuber E, Davidson IF, Tang W, Cisneros DA, Bhaskara V, Nishiyama T, Vaziri A, Wutz A, Ellenberg J and Peters JM. Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation *Nature* 501, 564-8 (2013). 査読有り

[学会発表](計 13 件)

招待講演

- 1) Tomoko Nishiyama. 40th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, Japan 2017 年 12 月
- 2) Tomoko Nishiyama. NIG meeting “Molecular Machineries for chromosomal structure and stability”, Mishima, Japan 2017 年 10 月
- 3) Tomoko Nishiyama. 10th ChemBio Hybrid lecture, University of Tokyo, Tokyo, Japan 2017 年 9 月
- 4) Tomoko Nishiyama. 3rd Next Generation Amphibian meeting, NIBB, Okazaki, Japan 2017 年 8 月
- 5) Tomoko Nishiyama. 29th Annual Bioengineering Symposium, Nagoya, Japan 2017 年 1 月
- 6) Tomoko Nishiyama. SMC conference, Tokyo, Japan 2013 年 11 月
- 7) Tomoko Nishiyama. NIG Joint Research Meeting, Mishima, Japan 2013 年 10 月
- 8) Tomoko Nishiyama. 65th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Nagoya, Japan 2013 年 6 月

口頭発表

- 9) Tomoko Nishiyama. 35th Chromosome workshop, Aichi, Japan 2017 年 12 月
- 10) Tomoko Nishiyama. 2nd SMC meeting, Yamagata, Japan 2017 年 6 月
- 11) Tomoko Nishiyama. 10th 3R Symposium, Matsue, Japan 2016 年 11 月
- 12) Tomoko Nishiyama. EMBO workshop: 1st SMC conference, Vienna, Austria 2015 年 5 月
- 13) Tomoko Nishiyama. 32nd Chromosome workshop, Hiroshima, Japan 2014 年 12 月

[図書](計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山朋子 (NISHIYAMA, Tomoko)
名古屋大学・理学研究科・准教授
研究者番号：90615535

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()