

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25711022

研究課題名(和文) コヒーシンが染色体接着と二重鎖切断修復に機能する機構の試験管内再構成による解析

研究課題名(英文) In vitro analysis of functions of cohesin in replication-coupled sister-chromatid cohesion and DNA double-strand break repair

研究代表者

高橋 達郎 (Takahashi, Tatsuro)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50452420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：コヒーシンによる姉妹染色体接着は正確な染色体分配と二重鎖切断修復に重要である。しかし、染色体接着がDNA複製と協調して起こるしくみや、コヒーシンが二重鎖切断修復に機能するしくみはよくわかっていなかった。本研究では、これらの反応の理解を目的に、ツメガエル卵抽出液、および精製タンパク質を用いた試験管内解析を行い、染色体接着の中心因子であるコヒーシンアセチル基転移酵素XEco2と複数のDNA複製因子との機能関係を明らかにした。さらに、DNA複製後、片方の姉妹鎖に二重鎖切断を導入する実験系を構築し、コヒーシンの修復への関与を解析した。本研究から、染色体接着とDNA複製の新たな接点が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Sister-chromatid cohesion, mediated by the cohesin complex, facilitates precise segregation of sister chromosomes at M-phase and promotes repair of DNA double-strand breaks (DSBs). However, how cohesin promotes those reactions has not been clearly understood. Using *Xenopus* egg extracts and biochemical reconstitution with purified proteins as model systems, we revealed functional relationship between XEco2 cohesin acetyltransferase, a key enzyme in the cohesion establishment reaction, and multiple replication proteins. We also constructed in vitro model systems for post-replicative DSB repair, and analyzed involvement of cohesin in the repair reaction. This study clarified novel functional interaction between sister-chromatid cohesion and DNA replication.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 染色体接着 相同組換え 二重鎖切断 ツメガエル卵抽出液 コヒーシン アセチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 複製により生じた姉妹染色体は、複製に伴ってコヒーシン複合体により接着される。染色体接着は二つの重要な反応のために必須である。まず染色体接着は M 期での姉妹染色体の同定と正確な分配に必要である。次に染色体接着は姉妹染色体間の相同組換えによる DNA 二重鎖切断損傷修復を促進する。

コヒーシンはリング型複合体であり、DNA 鎖を取り囲んで DNA と相互作用する。しかし、研究開始当時コヒーシンが姉妹の DNA 鎖を結びつける分子機構は明らかになっておらず、一つのリングが二本の DNA 鎖を束ねるモデル、一つのリングは一本の DNA 鎖と相互作用し、コヒーシン間の相互作用が接着に必要であるとするモデルなどが提唱されていた[1]。

(2) コヒーシンにより姉妹染色体が接着されるには、少なくとも 3 つの反応が必須である (図 1)。まず、コヒーシンは Scc2-Scc4 複合体により DNA 複製の前に染色体に乗せられる。次に、コヒーシンアセチル基転移酵素 (CoAT: ツメガエルでは XEco2) により、コヒーシン Smc3 サブユニットがアセチル化される。このステップは、酵母では DNA 複製時に起こると考えられている。最後に、コヒーシンは DNA 複製反応と協調して姉妹染色体を結びつける。脊椎動物では染色体接着の成立過程に sororin タンパク質が機能する。

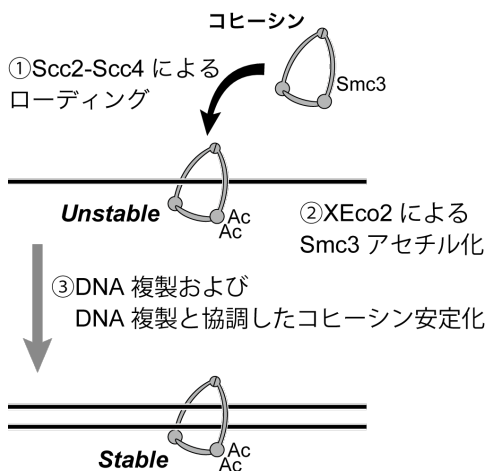


図 1 : 染色体接着反応の模式図

(3) コヒーシンは二重鎖切断 (DSB) 損傷の修復にも必要である[2]。興味深いことに、これは単に「コヒーシンによる姉妹鎖の近接保持が相同組換えに必要であるため」に留まらないことが示唆されていた。たとえば、DSB が起こると、DSB 部位へのコヒーシン結合と、新たな姉妹染色体接着成立反応が誘発される。このとき、CoAT は二重鎖切断に反応して活性化され、Smc3 ではなく他のサブユニットをアセチル化することが示唆されている。さらに、コヒーシンはチェックポイントキナーゼ ATM によりリン酸化され、このリン酸化はチェックポイント活性化と DNA 修復に必須である。

加えてコヒーシン分子の切断による分解も修復に必要である。

(4) 一方で、これらの反応の主要部分については、当時よくわかっていない点が数多く残されていた。たとえば、Scc2-Scc4 がどのような機構でコヒーシンを染色体に結合させ、CoAT によるコヒーシンのアセチル化はどのような機能を果たすのか、そして、コヒーシンはどのような機構で姉妹染色体を結びつけるのかといった染色体接着の根本的な問題は、当時ほとんど理解されていなかった。さらに、コヒーシンが二重鎖切断修復に機能するメカニズムについてもよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

(1) これらの背景を踏まえ、本研究ではコヒーシンが染色体接着、DNA 二重鎖切断損傷に機能する分子メカニズムを、ツメガエル卵抽出液を用いた試験管内再現系、および精製タンパク質を用いた再構成系によって解明することを目指した。

(2) 具体的には、まず Scc2-Scc4 コヒーシンローダー複合体によるコヒーシンローディング反応の理解を目標とした。次に、DNA 複製と協調した姉妹染色体接着反応のメカニズムの解明、特に CoAT がどのタイミングで、どのような機能を果たすのかを解明することを目指した。最後に、コヒーシンが DNA 二重鎖切断損傷修復に果たす役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ツメガエル卵の核質抽出液 (NPE) は間期核内環境を試験管内で再現し、DNA 複製や染色体接着を効率よく引き起こす。NPE は任意の DNA 基質を試験管内で複製・接着させることのできる唯一の実験系である。本研究では、NPE を用いて DNA 基質を試験管内で複製させ、DNA 複製と協調した姉妹染色体接着反応、あるいは DNA 複製後に起こる DNA 二重鎖切断損傷の修復反応を解析した。ツメガエル卵抽出液 (NPE) の作成は、既に発表済みの、標準的な方法を用いた。

(2) DNA 基質は、M13 ヘルパーファージを用いて作成した一本鎖環状プラスミドをもとに、相補鎖を試験管内合成することで作成した。必要に応じ、プライマー-DNA に化学修飾やミスマッチ塩基を導入することで、塩基特異的な化学修飾の導入、あるいは特異的なミスマッチ塩基対の導入を行った。

(3) 組換えタンパク質の発現、精製には、大腸菌もしくはバキュロウイルス発現系を用いた。バキュロウイルスの宿主細胞としては Sf9 細胞を利用した。タンパク質は、一般的なクロマトグラフィー担体を組み合わせ、中圧クロマトグラフィー装置を用いて精製した。

4. 研究成果

(1) Scc2-Scc4 によるコヒーシンローディング反応の試験管内再構成

① 本研究者らの過去の解析から、少なくともツメガエルにおいては Scc2-Scc4 コヒーシンローダータンパク質は Cdc7-Drf1 タンパク質リン酸化酵素と安定な複合体を作ることがわかってきた[3]。Cdc7-Drf1 は複製開始複合体に依存して DNA 上に結合することから、Cdc7-Drf1 が仲介役となって Scc2-Scc4 を染色体にロードし、さらに Scc2-Scc4 がコヒーシンをロードするという反応経路が予想された。この仮説を検証するため、Cdc7-Drf1、Scc2-Scc4、およびコヒーシンの精製と、試験管内でのコヒーシンローディング再構成を試みた。

② 本研究者らは、2012 年までに Scc2 の N 末端 100 アミノ酸と Scc4 の全長が安定な複合体を形成し、これが Cdc7-Drf1 との相互作用を有することを見いだしていた。そこでこの断片と Scc4 の複合体を精製し、Cdc7-Drf1 との機能的な相互作用を検証した。Cdc7-Drf1 のリン酸化酵素活性は Scc2-Scc4 ローディングに必要であることがわかってきたため、Scc2-Scc4 が Cdc7-Drf1 のリン酸化基質である可能性が想定された。試験管内リン酸化アッセイによってこの可能性を検証したところ、Scc4 が Cdc7-Drf1 存在化でリン酸化を受けることが示唆された。リン酸化サイトの特定と、変異体の作成、それによるリン酸化の機能解析が今後の課題である。

③ コヒーシンローディングの試験管内再構成のため、組換えコヒーシンを作成した。コヒーシンは、Smc1、Smc3、Rad21 の 3 サブユニットによるコアリング構造に、SA-1 あるいは SA-2 サブユニットがアクセサリとして結合した構造を取る。本研究ではこれら全てのサブユニットについて発現、精製系を確立し、Smc1-Smc3-Rad21 からなる 3-subunit cohesin、およびこれに SA-1 もしくは SA-2 が加わった、二種類の 4-subunit cohesin を精製した。SA-1 を含む 4-subunit cohesin については、コヒーシンを除去した卵抽出液中で染色体に結合すること、および sororin タンパク質のローディングを回復できることを確認した。

④ Scc2 は 3000 アミノ酸を越える巨大タンパク質である。本研究者らは、本研究以前に Scc2 の全長をクローニングしたバキュロウイルスを作成していた。これを用いてツメガエル Scc2-Scc4 複合体の精製を試みたが、Scc2 は非常に分解を受けやすく、十分な量のタンパク質を精製することはできなかった。これについては発現系の変更など今後の対策が必要である。

(2) DNA 複製と協調した姉妹染色体接着反応の試験管内モデル化と解析

① 本研究計画の開始時点までに、本研究者らはツメガエル卵抽出液中で主に機能する CoAT は XEco2 であること、XEco2 は DNA 複製開始複合体 (pre-replicative complex; pre-RC)

に依存して染色体にロードされることを明らかにしていた[4]。一方で出芽酵母 CoAT は複製伸長に関わる重要因子である PCNA と相互作用することがわかっていた[5]。

② CoAT が DNA 複製のどの時点で機能するかを解明するため、XEco2 の様々な変異体を作成した。XEco2 は N 末端側にクロマチン結合ドメイン、C 末端側に酵素活性部位を持つ。そこで N 末端領域と C 末端領域の間に TEV プロテアーゼサイトを組み込み、TEV プロテアーゼによって XEco2 の二つのドメインを切り離せる実験系を構築した。これを用いて XEco2 をコンディショナルに不活化したところ、XEco2 は DNA 複製前に Smc3 をアセチル化するにもかかわらず、sororin が染色体に結合するには、DNA 複製開始後にも XEco2 の活性が要求されることがわかった。sororin の染色体結合は、コヒーシンの姉妹染色体接着活性と直結していると考えられている。したがってこの結果は、XEco2 が DNA 複製中に Smc3、あるいは別の基質をアセチル化することによって、コヒーシンへの sororin 結合が可能となることを示唆する。

③ このときの基質を解明するため、アセチル CoA のアルキル化アナログを用い、XEco2 基質の網羅的な標識を試みた。アルキル化アナログの検出には、銅を触媒としたクリック反応による蛍光色素付加を利用した。この方法によって、XEco2 に依存した Smc3 のアルキル化アセチル CoA アナログ修飾が検出できたため、本手法の有効性は確認できた。しかしながら、Smc3 以外に XEco2 に依存した修飾は確認できなかった。この結果は、Smc3 が XEco2 の主たるアセチル化標的であることを示すが、他の標的のアセチル化の有無については今後の解析が必要である。

④ sororin の染色体結合には、XEco2 の機能が DNA 複製中に要求されるという、②で示した実験結果は、XEco2 が複製開始因子に加えて複製伸長因子とも相互作用する可能性を示唆する。明らかな候補は PCNA である。そこで PCNA のさまざまな変異体を作成し、sororin のローディングに対する影響を調べた。PCNA は複製必須因子であり、これと対応して多くの変異体は DNA 複製に欠損を示した。ところが一つの変異体については、DNA 複製のキネティックスへの影響は観察されないにもかかわらず、sororin の染色体結合が著しく減少していた。この結果は、PCNA が DNA 複製の促進以外の何らかの経路で sororin loading に関わっていることを示す。

⑤ 以上の結果は、XEco2 が PCNA と共に機能する事で sororin loading を促進する可能性を強く疑わせる。そこで、XEco2 と PCNA の相互作用を検討した。方法として、精製タンパク質を用いたプルダウン法、および表面プラズモン共鳴を用いた相互作用解析を用いた。しかしながら予想に反し、XEco2 と PCNA の物理的相互作用はこれらの方法では確認できなかった。表面プラズモン共鳴からは、二つの因

子の相互作用の K_D は数 μM 以上であることが推定され、二つの因子の細胞内濃度を考慮すると、単独因子間の直接の機能的相互作用の可能性は疑わしい。しかしながら、間接的な相互作用は否定されないし、タンパク質の修飾などによる相互作用の制御も否定されない。この点については今後のさらなる検討が必要である。

⑥では、XEco2 はどのような機構によって DNA 複製と協調して機能するのだろうか。XEco2 は pre-RC に依存して染色体に結合するので、pre-RC の構成因子と XEco2 の直接の相互作用が疑われた。この可能性を酵母 2-hybrid 法により検討したところ、予想通り pre-RC の主要な構成因子である Mcm2-7 複合体のサブユニットと XEco2 の相互作用が見られた。Mcm2-7 は複製開始時に Cdc45、GINS と相互作用して CMG ヘリカーゼとなる。面白いことに、XEco2 と CMG の特異的サブユニットとの相互作用も観察され、XEco2 がヘリカーゼと直接結合して複製フォークに局在する可能性が示唆された。Mcm サブユニットと XEco2 の相互作用に必要な領域は XEco2 の染色体結合に必要な領域なので、この反応が XEco2 の機能を DNA 複製と結びつける鍵かもしれない。

(3) DNA 二重鎖切断損傷に応答するコヒーシンの動作と機能

①主に出芽酵母での解析から、コヒーシスが二重鎖切断損傷修復に機能する事が示されており、高等動物でもこれが保存されていることを示す証拠が報告されている。コヒーシスは S 期以降に姉妹 DNA 鎖を結びつけるため、コヒーシンの関与する二重鎖切断修復は、S 期から G2 期にかけて起こる、姉妹 DNA 鎖の片側に発生する二重鎖切断の修復であると予想される。

②ポスト DNA 複製時の二重鎖切断損傷をモデル化するには、複製後の姉妹 DNA 鎖を何らかの方法で区別する必要がある。この目的のため、一塩基ミスマッチを持つプラスミド DNA を作成した。DNA 複製は鋳型鎖に対して相補鎖を合成する反応であるため、一塩基ミスマッチを持つプラスミドを複製すると、一塩基対の違いを持つ二つの娘 DNA が生じる。このとき、一塩基の違いがそれぞれ異なる制限酵素サイトとなるように設計することで、二つの娘 DNA を酵素的に区別することが可能となる。さらに、片方の娘 DNA に対して選択的に二重鎖切断を導入することも可能となる。

③このような基質を作成し、NPE を用いて反応させたところ、予想通り二種の娘 DNA が形成され、そのうちの一方に選択的に二重鎖切断を導入することにも成功した。このときの修復経路として相同組換えが使われている痕跡は発見できず、非同相末端結合が主であると推測された。一方意外なことに、コヒーシンを系から除去した場合においても、導入した DNA 二重鎖切断損傷の修復効率、および修復経路に明らかな違いは見られなかった。

④プラスミド基質は数 kb 程度と小さいために相同組換えが効率よく起こらない可能性を考え、精子核染色体を基質に、ニック制限酵素の存在下で DNA 複製を行わせた。DNA 複製フォークがニック部位を通過すると、二つの娘 DNA のうち、ニック鎖を鋳型とする一方のみに二重鎖切断が生じるはずである。予想通り、ニック制限酵素の存在下では、複製に依存して一本鎖結合タンパク質 RPA、相同組換え因子 Rad51 の染色体上への蓄積が観察され、複製依存的な二重鎖切断の形成が示唆された。このときコヒーシンを卵抽出液から除去すると、RPA の蓄積が亢進することがわかった。この結果は、コヒーシスが DNA 複製中に生じる二重鎖切断損傷への応答に関与する可能性を示唆する。

(4) 本研究からの派生研究

DNA の相同性を利用した二重鎖切断修復経路には、Rad51 に依存した相同組換え経路のほかに、Rad52 に依存した一本鎖アニーリング経路も存在する。複製後に娘鎖の一方のみに二重鎖切断を導入した場合、Rad51 依存の相同組換えは観察できなかったが、その他の相同組換え経路については検討していなかった。そこで切断部位の両側に相同領域を持たせ、一本鎖アニーリングによる修復が可能となる基質を作成した。この基質を使って、まず DNA 複製を介さずに二重鎖切断を導入したところ、一本鎖アニーリングによる修復が効率よく起こることが確認された。先行研究から NPE が一本鎖アニーリングを引き起こすことは知られていたが [6]、本研究で観察された一本鎖アニーリング反応は先行研究よりもはるかに効率よく起こっており、相同性依存的な組換えモデル系として有用であると予想された。現在、複製後に一本鎖アニーリングを誘発する実験系を構築し、DNA 複製後に起こる一本鎖アニーリングにコヒーシスが果たす役割について検討中である。

引用文献

- [1] Nasmyth, K., & Haering, C. H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 43, 525-558.
- [2] Watrin, E., & Peters, J.-M. (2006). Cohesin and DNA damage repair. *Experimental Cell Research*, 312(14), 2687-2693.
- [3] Takahashi, T. S., Basu, A., Bermudez, V., Hurwitz, J., & Walter, J. C. (2008). Cdc7-Drf1 kinase links chromosome cohesion to the initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *Genes & Development*, 22(14), 1894-1905.
- [4] Higashi, T. L., Ikeda, M., Tanaka, H., Nakagawa, T., Bando, M., Shirahige, K., et al. (2012). The Prereplication Complex Recruits XEco2 to Chromatin to Promote Cohesin Acetylation in *Xenopus* Egg

Extracts. *Current Biology*, 22(11), 977-988.

[5] Moldovan, G.-L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2006). PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Molecular Cell*, 23(5), 723-732.

[6] Yan, H., Toczylowski, T., McCane, J., Chen, C., & Liao, S. (2011). Replication protein A promotes 5'→3' end processing during homology-dependent DNA double-strand break repair. *The Journal of Cell Biology*, 192(2), 251-261.

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 6 件)

①PCNA Retention on DNA into G2/M Phase Causes Genome Instability in Cells Lacking Elg1.
Johnson C, Gali VK, Takahashi TS, Kubota T
Cell reports, 16, 684-695, 2016

②MutS α maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading.
Kawasoe Y, Tsurimoto T, Nakagawa T, Masukata H, Takahashi TS
eLife, e15155, 2016

③Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors.
Shintomi K, Takahashi TS, Hirano T
Nature Cell Biology, 17, 1014-1023, 2015

④RecQ4 promotes the conversion of the pre-initiation complex at a site-specific origin for DNA unwinding in *Xenopus* egg extracts.
Sanuki Y, Kubota Y, Kanemaki MT, Takahashi TS, Mimura S, Takisawa H
Cell Cycle, 14, 1010-1023, 2015

⑤Thymine DNA Glycosylase Is a CRL4(Cdt2) Substrate.
Slenn TJ, Morris B, Havens CG, Freeman RM, Jr, Takahashi TS, Walter JC
Journal of Biological Chemistry, 289, 23043-23055, 2014

⑥MutS stimulates the endonuclease activity of MutL in an ATP-hydrolysis-dependent manner.
Shimada A, Kawasoe Y, Hata Y, Takahashi TS, Masui R, Kuramitsu S, Fukui K
FEBS Journal, 280, 3467-3479, 2013

全て査読有り

[学会発表] (計 6 件)

①粥川 太貴、東 寅彦、中川 拓郎、升方 久夫、高橋 達郎
コヒーシスが複製後の DSB 修復に機能する機構の新規試験管内系による解析
第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会 合同年会
12/2/2015、兵庫県神戸市、神戸国際会議場

②東 寅彦、中川 拓郎、升方 久夫、高橋 達郎
XEco2 は Mcm2-7 と相互作用し DNA 複製に依存した Sororin 染色体結合反応に機能する
第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ
10/20/2015、静岡県焼津市、焼津グランドホテル

③高橋 達郎、東 寅彦、林 冨、中川 拓郎、升方 久夫
PCNA と XEco2 は DNA 複製と協調した Sororin 染色体結合反応に機能する
第 37 回日本分子生物学会年会
11/27/2014、神奈川県横浜市、パシフィコ横浜

④東 寅彦、林 冨、中川 拓郎、升方 久夫、高橋 達郎
PCNA and XEco2 couple chromatin loading of Sororin to DNA replication in *Xenopus* egg extracts
The 9th 3R Symposium
11/18/2014、静岡県御殿場市、ホテル時之栖

⑤東 寅彦、中川 拓郎、升方 久夫、高橋 達郎
Coupling of cohesin acetylation to the process of DNA replication in *Xenopus* egg extracts, The 18th IMCB Symposium, SMC proteins -from molecule to disease-
11/29/2013、東京都文京区、東京大学弥生講堂

⑥東 寅彦、中川 拓郎、升方 久夫、高橋 達郎
Essential roles of the N-terminal region of XEco2 acetyltransferase for cohesion establishment in *Xenopus* egg extracts
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting Eukaryotic DNA replication & Genome Maintenance
9/11/2013, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 達郎 (TAKAHASHI, Tatsuro)
九州大学大学院理学研究院・准教授
研究者番号：50452420

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

東 寅彦 (HIGASHI, Torahiko)
河添 好孝 (KAWASOE, Yoshitaka)
山口 陽子 (YAMAGUCHI, Yohko)
照井 利輝 (TERUI, Riki)
林 冴 (HAYASHI, Sae)
粥川 太貴 (KAYUKAWA, Taiki)
織田 里美 (ODA, Satomi)