

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04718

研究課題名(和文) コヒーシンアセチル化酵素による転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of cohesin acetyltransferase on transcriptional regulation

研究代表者

坂東 優篤 (Bando, Masashige)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：90360627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：コヒーシンは、ゲノム構造を形成し、転写制御に機能する複合体であるが、その分子機序について不明である。転写が活性化される際に起こるゲノム上のタンパク質の動態をin vitroアッセイ系を用いて解析した。テンプレートDNA上では転写開始前複合体に加え、コヒーシンローダーやSEC、ESCO1が会合した。さらに、コヒーシンローダーとSECのPICへの会合は競合的に起こる可能性を示した。ESCO1やESCO2は、コヒーシンとは異なり、局所的にゲノム構造に影響し、遺伝子発現が変化することを見出した。また、ESCO2はMCMと結合することで活性を発揮し、そこから乖離すると分解される新たな仕組みを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コヒーシンがゲノム構造を構築する重要な因子で、広く生理的な機能に重要な役割を担うことは知られているが、その詳細な機構についてはほとんど知られていない。本成果で用いたin vitroアッセイ系は、転写制御における分子機能に焦点を絞った解析を進めることができ、コヒーシン機能だけでなく幅広い転写制御のメカニズムへの展開が期待される。また、本成果のESCOの機能や制御機構の理解は、コヒーシンと深く関わる癌や遺伝病の発症メカニズムの解明やその治療の標的分子として意義がある。

研究成果の概要(英文)：Cohesin regulates transcription through genome structure, but their detail molecular mechanisms are unknown. The dynamics of many proteins in the genome during the activation of transcription was analyzed using the in vitro assay system. And we observed the assembly of the cohesin loader, SEC, and ESCO1 in the addition of the preinitiation complex (PIC) on the template DNA. Cohesin loader was stably associated with PIC during the pausing. Moreover, the association of the cohesin loader and the SEC to the PIC may be competitive. ESCO1 and ESCO2, unlike cohesin, were found to locally affect genome structure, resulting in changes in gene expression. In addition, we found a new mechanism in which ESCO2 is activated by binding to MCM and is degraded when it is dissociated from MCM.

研究分野：生化学

キーワード：コヒーシン 転写制御 アセチル化 DNA複製 ゲノム構造

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コヒーシスが、姉妹染色分体間接着の機能を発揮するには、ESCO1 と ESCO2 によりアセチル化が必須である。両者は、異なる染色体上で異なる挙動、制御を受け機能する。ESCO1 は、細胞周期を通して、コヒーシンのサブユニット PDS5 を介して染色体上に局在し、一方で、ESCO2 は S 期に DNA 複製と連携して MCM を介することで姉妹染色分体間の接着に機能することを見出した。また、コヒーシスは、高等真核生物では、転写調節に寄与し、ヒトではコヒーシスおよびコヒーシス制御に関わる遺伝子の変異から、この機能の破綻に起因する遺伝子疾患が知られている。コヒーシスは、染色体上で主に CTCF と共局在し、ゲノム構造の形成に関わり、エンハンサーとプロモーターの安定的な相互作用への関わりが示唆されている。実際、コヒーシス関連の遺伝病と類似の病態を示す CHOPs を見出し、その原因遺伝子である AFF4 の持つ機能、転写伸長制御とコヒーシスの機能の連携の可能性について示した。

### 2. 研究の目的

コヒーシスの転写制御における機能および詳細な分子メカニズムはほとんど明らかになっておらず、また、この転写制御においてコヒーシンのアセチル化がどのように寄与するかについても不明である。そこで、ESCO1 及び ESCO2 のコヒーシンアセチル化酵素がどのような制御を受け、ゲノム上でいつ、どこで、どのようにコヒーシスをアセチル化するのか、また、コヒーシンアセチル化が転写制御においてどのような役割を果たすのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

**In vitro 転写反応系を用いた解析** 5xGAL4 結合ドメイン及びプロモーター配列もつテンプレートにアクチベータタンパク質 (GAL4-VP16) をあらかじめ結合し、その後、細胞の核抽出液 (NE; Nuclear Extract) を加え、反応処理をする。その際、NTPs を加えることで、転写反応を活性化させ、テンプレート上に結合したタンパク質群を検出する。

**ESCO と相互作用する因子の探索及び修飾や相互作用ドメインの同定** タンパク質を特異的な抗体もしくはタグ抗体で免疫沈降により精製し、沈降物を質量分析装置もしくはウェスタンブロットに解析する。

**ChIPseq 解析による染色体上のタンパク質動態解析** 細胞周期を同期若しくは薬剤で処理した細胞を固定し、特異的な抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行う。免疫沈降した DNA をライブラリ化し、次世代シーケンサにより配列決定し、情報統計解析により染色体局在プロファイルを得る。

**Hi-C 解析によるゲノム構造の決定** 固定化した細胞の核内のゲノムを制限酵素で切断処理し、その後、立体的に近接する末端同士を連結する。その連結部分の DNA を精製、ライブラリ化し、次世代シーケンサで配列決定する。得られた配列情報を、統計的に処理解析することで、近接配置した領域を抽出することでゲノム構造を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) in vitro 転写反応系による PIC 及び EEC の形成とコヒーシンローダーの会合

In vitro 転写反応系を用いた解析を行うと、GAL4-VP16 に依存して、Mediator、基本転写因子、RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) を含む PIC (Preinitiation Complex) 構成因子や Super Elongation Complex (SEC)、BRD4 などの転写制御因子に加えて、コヒーシンローダー Nipbl-Mau2 さらに、ESCO1 のテンプレート DNA 上への会合が検出された (図 1)。さらに、NTPs を添加すると、RNAPII の CTD の 2 番目 (S2p) や 5 番目 (S5p) のリン酸化され、Mediator などのいくつかの因子についてもリン酸化が観察された。また、基本転写因子は PIC から完全に乖離し、コヒーシンローダーの会合量の減少が見られた。このとき、CDK9 の阻害剤処理は RNAPII の S2p の阻害と多くの因子のリン酸化を阻害する一方で、Pausing 因子の結合及びコヒーシンローダーなどの因子の会合量の増加がみられ、PIC の安定化が見られた。

また、NE から Mediator 複合体をこの構成因子の抗体を用いて除去し、in vitro アッセイを行うと、コヒーシンローダーを始め、SEC などの会合の減少が観察された。コヒーシンローダーや SEC などの転写制御因子は、メディエーター複合体を介して転写装置に組み込まれることが明らかとなった。

コヒーシンローダー Nipbl の ChIP-seq 解析を行うと、実際エンハンサーやプロモーターの領域に局在し、CDK9 の阻害剤を処理すると局在量及び局在領域数の増加が観察され、in vitro と類似

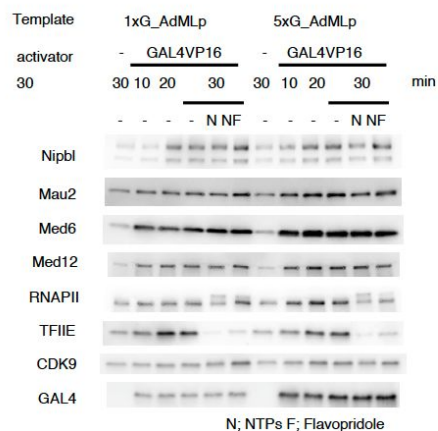


図1 in vitro 転写反応アッセイによるタンパク質動態

した結果が得られた(図2)。ここで、コヒーシソローダー及び ESC01 がどのようにエンハンサー領域に局在するかその一端を明らかに出来た。今後、この系を応用し、コヒーシソンの会合、ゲノムの立体構造がどのようにできるかについて in vitro で再構成を目指して進めていく。

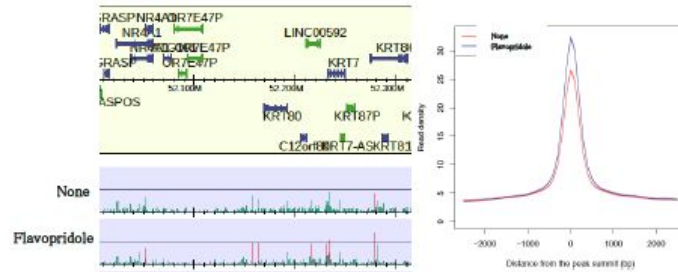


図2 Nipbl ChIPseq

## (2) コヒーシソローダーによる SEC の動態への影響

コヒーシソローダーや AFF4 を抗体により除去した NE を用いて、in vitro アッセイを行なった。コヒーシソローダーを

除去すると、PIC 形成には影響を与えなかったが、NTPs 存在下では RNAPII のリン酸化の亢進が見られた。一方で、AFF4 を除去すると、SEC を構成する ELL、p-TEFb、ENL など同時に NE から減少しているのが見られた。このとき、コヒーシソローダーの会合の増加が観察された。この結果は、コヒーシソローダーと SEC の転写装置へのリクルートが互いに拮抗して起こることを示しており、転写伸長への移行段階での厳密な制御に関わっている可能性が考えられた。これは、これまで我々が実際、CdLS や CHOPs で見られた現象と類似したものであり、より詳細に解析を進めていく事で、その病態の発症メカニズムに迫る事ができると考えられる。

## (3) in vitro 転写反応系を利用した様々な条件下でのタンパク質動態の検証

上記以外に、テンプレートのプロモーターやエンハンサーを改変したものや異なるアクチベータを用いて、in vitro アッセイによるタンパク質動態の解析を行なった。その結果、いくつか興味深い結果を得た。プロモーター欠失させたテンプレートでは基本転写因子などの結合は弱められたが、実際の遺伝子プロモーターを利用した結果ではほとんど変化が見られなかった。5つの連続した結合配列をもつエンハンサーは、1つの配列に比べ、メディエーターなどのいくつかの因子の会合量が増加し、さらにその集積する時間も短かった(図1)。しかし、一方で、単純にアクチベータの増えた結合量とは相関がなかった。このことは複数のエンハンサーをもつスーパーエンハンサーによる転写制御を理解する上で重要な知見かもしれない。また、GAL4-TP53、ER、VDR、E1A などの活性化ドメインや全長 ER などのアクチベータを用いて、in vitro アッセイを行なったところ、Mediator の有無や会合する因子群が異なり、コヒーシソローダーの会合能も異なった。このように異なったアクチベータを組み合わせた、より長く生理的な機能に近い配列を用いる事で、ゲノム上でどのように転写因子などを配置し遺伝子発現を制御するのかについて理解を進めることができると考えられる。

## (4) ESC02 の解析

### ESC02 と MCM の相互作用と活性制御

細胞から核タンパク抽出液を作製し、ESC02 を免疫沈降し、その沈降物を質量分析による解析を行なった。その結果、MCM サブユニットがすべて同定された。MCM と結合できない変異 ESC02 を作出し、その変異タンパク質は in vitro の相互作用実験では、MCM と結合できないことを確認し、そのタンパクを細胞に発現するとプロテアソーム経路により分解されることがわかった。実際、細胞を用いて MCM ノックダウン実験を行うと、ESC02 が不安定化された。以上のことから、ESC02 が働く際に DNA に結合した MCM にリクルートされ、安定化し、DNA 複製と共にコヒーシソにアクセスすることでアセチル化していることがわかった。ESC02 の ChIPseq 解析を行なったところ、ESC02 は、S 期初期において、すでに複製が終了した領域よりも、後期に複製されるヘテロクロマチン領域に多く濃縮が見られ、複製進行に伴い、その領域の減少が見られた。この局在像は、MCM の領域のプロファイルと類似していた。

### CuI4 ユビキチンリガーゼによる ESC02 の分解

ESC02 は、DNA 複製終了後 G2 期から分裂期にかけて消失する。この消失は、CuI4-VPRBP ユビキチン経路を介したプロテアソーム分解によるものであった。さらに、ESC02 は、分裂期から G1 期にかけて、APC ユビキチン経路による分解も受け、完全に除去するシステムが存在することがわかった。ここまでのいくつかの結果を、論文にまとめて報告した。

### ESC02 のリン酸化

ESC02 が G1 期から S 期にかけ CDK2 にリン酸化されることを明らかにした。ESC02 を精製し、リン酸化部位を質量分析装置で同定した。このリン酸化は、MCM との結合には影響を与えなかったが、非リン酸化型はより不安定化し、リン酸化型変異はより安定化した。以上の結果から、リン酸化状態が ESC02 のタンパク質の挙動を決定している可能性があり、上記で明らかにしたユビキチン経路との関係について詳細に解析を行う。

## (5) ESC01 及び ESC02 によるゲノム構造解析

RPE 細胞を ESC01 及び ESC02 でノックダウンし、RNA-seq 解析及び Hi-C 解析を行なった。その結果、TAD やゲノム上の領域間相互作用などのゲノム全体の構造へはほとんど影響がみられな

かった。しかし、活性化/不活性化クロマチン領域成分の一部の変化がみられ、遺伝子発現の変動が観察された。このような変化は、コヒーシンやコヒーシンローダーのKDによる染色体構造の与える影響や遺伝子発現変動パターンとは異なるものであった。この結果は、ESCO、もしくはコヒーシンのアセチル化がより局所的な領域間の相互作用に影響を与えることで転写調節を行なっている可能性の知見となる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

1. Kline AD, Krantz ID, Bando M, Shirahige K, Chea S, Sakata T, Rao S, Dorsett D, Singh VP, Gerton JL, Horsfield JA, Calof AL, Katz O, Grados M, Raible S, Barañano K, Lyon G, Musio A, Carrico CS, Clemens DK, Caudill P, Massa V, McGill BE, Domestrup A, O'Connor J, Haaland RE. Cornelia de Lange syndrome, related disorders, and the Cohesin complex: Abstracts from the 8th biennial scientific and educational symposium 2018. Am J Med Genet A. (2019) 査読有り Mar 15. doi: 10.1002/ajmg.a.61108.
2. Minamino M, Tei S, Negishi L, Kanemaki MT, Yoshimura A, Sutani T, Bando M, Shirahige K. Temporal Regulation of ESCO2 Degradation by the MCM Complex, the CUL4-DDB1-VPRBP Complex, and the Anaphase-Promoting Complex. Curr Biol. 28 2665-2672 (2018) 査読有り doi: 10.1016/j.cub.2018.06.037.
3. Fujita Y, Masuda K, Bando M, Nakato R, Katou Y, Tanaka T, Nakayama M, Takao K, Miyakawa T, Tanaka T, Ago Y, Hashimoto H, Shirahige K, Yamashita T. Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. J Exp Med. 2017 214 1431-1452. (2017) 査読有り doi: 10.1084/jem.20161517. Epub 2017 Apr 13.

### 〔学会発表〕(計4件)

Masashige Bando and Katsuhiko Shirahige, The Study for Molecular Function and Dynamics of Nipbl in Transcriptional Regulation using Biochemical Approach., Eighth Biennial Cornelia de Lange Syndrome Scientific & Educational Symposium., (2018)

Masashige Bando, Kazuhiro Akiyama, Katsuhiko Shirahige., Analysis of Cohesin loader on transcriptional regulatory complex during the activation in vitro system., SMC proteins Chromosomal organizers from bacteria to human., (2017)

Masahige Bando, Kazuhiro Akiyama, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige., Cohesin loader regulates transition from pausing to elongation of RNA PolII., Epigenetics and chromatin Cold spring harbor meeting., (2016)

坂東 優篤 コヒーシンによる転写伸長反応の制御 第68回 日本細胞生物学会大会 (2016)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：中戸 隆一郎

ローマ字氏名：Nakato, Ryuichiro

所属研究機関名：東京大学

部局名：定量生命科学研究所

職名：助教

研究者番号(8桁): 60583044

(2)研究協力者

研究協力者氏名：南野 雅

ローマ字氏名：Minamino, Masashi

研究協力者氏名：坂田 豊典

ローマ字氏名：Sakata, Toyonori

研究協力者氏名：吉村 充騎

ローマ字氏名：Yoshimura, Atsunori

研究協力者氏名：石橋 舞

ローマ字氏名：Ishibashi, Mai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。