

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02372

研究課題名(和文) 姉妹染色分体間接着による局所クロマチン構造変換機構

研究課題名(英文) Understanding of spatial regulation of sister chromatid cohesion

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヘテロクロマチン領域における接着確立機構を明らかにすることを目指した。ヘテロクロマチンに集積する接着確立因子Dalmatian(Dmt)の結合因子の網羅的スクリーニングから得られた遺伝子のひとつであるクロマチンリモデリング因子BAP180のノックダウンは顕著な接着異常を引き起こし、このとき、Dmtのヘテロクロマチン局在が阻害された。この接着異常は、Dmtの過剰発現により回復したことから、Dmtのヘテロクロマチン局在をBAP180が促進することで、ヘテロクロマチン領域の接着が確立されている可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの接着研究においては、DNAとコヒーシスが一对一の関係で論じられ、DNA側を取り巻く環境との関連は考慮されて来なかった。本研究ではクロマチン環境と接着機能の関係に着目した初めての研究となる点で、学術的意義がある。さらに本研究の成果は、ヘテロクロマチン領域における複製や転写といった接着以外の現象の分子機構理解にも繋がるだけでなく、接着機構のヘテロクロマチン以外の染色体環境への適応機構を理解する手がかりにもなり、染色体研究分野に大きな波及効果をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand the mechanisms of how sister chromatid cohesion in heterochromatin region is established. Dalmatian (Dmt) is known as a cohesion establishment factor in *Drosophila melanogaster*. Through non-biased screening of Dmt-binding proteins, we identified 25 candidate genes, of which knockdown exhibited abnormal cohesion. Among them, we found that BAP180, a subunit of PBAP chromatin remodeling complex, is essential role in cohesion. In BAP180-depleted cells, Dmt couldn't be localized to heterochromatin, however cohesin itself normally associated with chromatin. Overexpression of Dmt restored cohesion in BAP180-depleted cells. These results suggest that BAP180 has a crucial role in cohesion establishment in heterochromatin by regulating Dmt localization.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：クロマチン 姉妹染色分体間接着

1. 研究開始当初の背景

姉妹染色分体間接着は、DNA複製によって作られた二本のDNA同士を繋ぎ止めることで、遺伝情報の均等分配を保障する機構である。接着はセントロメア近傍ヘテロクロマチン領域に濃縮しており、この領域に十分な接着が形成されることが、正確な染色体分配にとって不可欠である。しかしながら、どのようにしてセントロメア近傍ヘテロクロマチン領域で接着が確立されているのか、その詳細は不明である。

接着を担うコヒーシ複合体は、真核生物の間で広く保存されたリング状のタンパク質複合体であり、近年ではクロマチン高次構造制御因子としても着目されている。コヒーシはそのリング構造がDNAをトポロジカルに抱え込むことで2本のDNAを接着していると考えられているが、コヒーシだけでは接着に不十分であり、コヒーシの結合・修飾因子が接着の確立・解除に必要である。染色体上で接着の重要性が最も高い場所がセントロメア近傍ヘテロクロマチン領域であるという事実の一方で、コヒーシとDNAのトポロジカルな関係性や、コヒーシリング内径等の物理的制約を考慮すると、ヌクレオソーム密度の高いクロマチン構造中に接着を濃縮することには物理的困難が予想され、クロマチン構造を弛緩させる何らかの仕組みが必要であると考えられる。しかしながら、ヘテロクロマチン領域でどのようにして接着が確立されているのか、そのメカニズムについては分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、接着マシナリーがその機能を適切に遂行するために、局所的にクロマチン構造を変化させる機構を明らかにする。接着機構はその普遍的な重要性故に、あらゆる染色体環境に対応しなければならないという問題と常に直面している。とくにヘテロクロマチン領域は接着の重要性が最も高い部位でありながら、同時に高密度にヌクレオソームが存在するために、接着遂行に物理的困難が予想される。本研究では特にヘテロクロマチン領域に着目し、高密度ヌクレオソーム環境中で接着が確立されるメカニズムを明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 接着確立因子 Dmt 結合因子からの接着必須因子の網羅的同定

脊椎動物の接着確立因子 Sororin のショウジョウバエオースログである Dalmatian (Dmt) は、セントロメア近傍ヘテロクロマチン領域に高レベルで局在している。本研究では Dmt 結合因子を手がかりにヘテロクロマチンにおける接着機構を明らかにする。Dmt の結合因子は、ショウジョウバエ S2 細胞に Dmt-EGFP を恒常的に発現させ、EGFP 結合タンパク質である GFP nanobody を付加したビーズを用いて Dmt-EGFP を沈降させ、共沈降するタンパク質を質量分生により網羅的に同定した。これらの同定した遺伝子について、dsRNA を *in vitro* 合成したのち、S2 細胞においてノックダウンを行い、分裂期染色体の接着が正常でない遺伝子を同定した。顕著な表現型を示した遺伝子について、再度 Validation screening を行い、表現型の有無を確定させた。

(2) 結合因子の局在解析と接着異常表現型の解析

同定した Dmt 結合因子について、GFP 融合タンパク質をショウジョウバエ S2 細胞に発現させ、間期クロマチン上での局在を調べた。また、当該因子ノックダウンによる接着異常の原因を明らかにするため、コヒーシと Dmt の発現量やクロマチン結合量をウェスタン解析と免疫蛍

光染色により比較し、当該因子のノックダウンによる接着欠損が Dmt の過剰発現により回復するかを調べた。

4. 研究成果

(1) 接着確立因子 Dmt 結合因子からの接着必須因子の網羅的同定

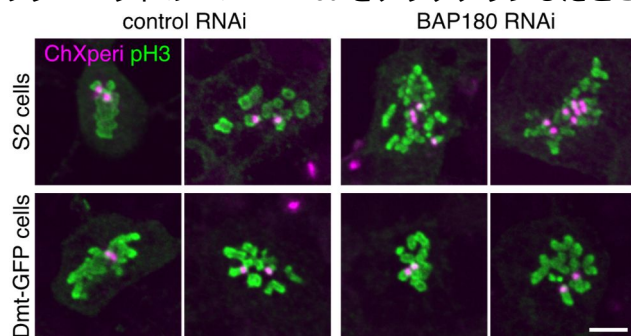
本研究ではまず、ショウジョウバエ S2 細胞を用いて、ヘテロクロマチンに局在する接着確立因子 Dalmatian (Dmt) の結合因子から接着必須因子の同定を行った。Dmt の C 末端側に EGFP を融合させた Dmt-EGFP 発現ベクターをショウジョウバエ S2 細胞に導入し、Dmt-EGFP 恒常発現細胞を作製した。この Dmt-EGFP 発現細胞において、Dmt-GFP は内在性 Dmt と同様の挙動を示すことを確認した。EGFP に結合する性質をもつ GFP nanobody を付加したビーズを用いて Dmt-EGFP 恒常発現細胞から Dmt-EGFP をプルダウンし、結合タンパク質を質量分析によって網羅的に同定した。プルダウン実験のネガティブコントロールには EGFP 発現細胞を用いた。

ネガティブコントロールの EGFP プルダウンでは同定されない因子、合計 341 遺伝子について、dsRNA を *in vitro* 合成し、S2 細胞においてノックダウンを行い、それぞれにおける分裂期染色体の形態を調べた。その結果、弱い表現型も含めた 55 遺伝子について接着異常が観察され、それらについてさらに Validation screening を行い、最終的に、姉妹染色分体間接着異常を示す 25 遺伝子を得た。これらの中には、完全な接着不全を示すもの、比較的マイルドな接着異常を示すもの、あるいは、逆に過剰接着の表現型を示すものも含まれていた。興味深いことに、姉妹染色分体間接着異常を示す 25 遺伝子のうち、7 遺伝子は転写・翻訳に関わる因子であり、この結果は、接着に必要な因子の転写あるいは翻訳が阻害されることによって接着異常を引き起こすと考えられた。

(2) クロマチンリモデリング因子 Brahma の接着機能解析

同定された遺伝子群の野中でも、特に接着異常が顕著に見られたクロマチンリモデリング複合体のサブユニット、Brahma/SNF2 に着目した。Brahma は姉妹染色分体間接着の破綻が顕著な遺伝子の一つであり、PBAP/PBAF 複合体サブユニットの一つ BAP180 をノックダウンしたところ、顕著な接着異常が観察された (図 1

上段)。PBAP 複合体は Dmt と *in vitro* および *in vivo* において結合し、BAP180 ノックダウンにより、Dmt のクロマチンへの結合が顕著に減少した。一方、コヒーシンのクロマチンへの結合は BAP180 のノックダウンにより阻害されなかった。



また、Dmt の過剰発現により、BAP180 ノ

図 1 BAP180 ノックダウン細胞では接着が破綻する

ックダウンによって阻害された接着が回復した (図 1 下段)。BAP180 の局在をしらべたところ、BAP180 はヘテロクロマチンだけではなく、その他のクロマチン領域にも一様に結合している様子が観察された。一方 Dmt はヘテロクロマチンに強く局在するが、BAP180 ノックダウンにより、ヘテロクロマチンへの集積が見られなくなった (図 2)。以上の結果より、コヒーシン自身というより、むしろ Dmt のヘテロクロマチンへの結合を、クロマチンリモデリング因子が制御していることが明らかとなった。この結果は、高密度ヌクレオソーム状態のヘテロクロマチン領

域において積極的に接着を確立するため、クロマチンリモデリング因子が、接着確立因子 Dmt のヘテロクロマチンへの局在を促進している可能性を強く示唆している。

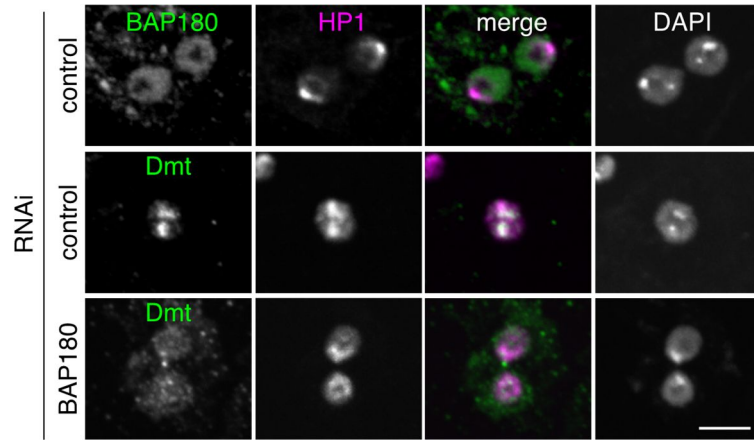


図2 BAP180 ノックダウンにより Dmt のヘテロクロマチン局在が減弱する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishiyama Tomoko	4. 巻 75
2. 論文標題 Compartments in the Ring	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 201 ~ 203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2019.07.002	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoko Nishiyama	4. 巻 58
2. 論文標題 Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 8-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceb.2018.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 西山 朋子
2. 発表標題 Opening of cohesin's Smc ring is essential for timely DNA replication
3. 学会等名 第38回 染色体ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山 朋子
2. 発表標題 コヒーシンの構造とゲノム機能
3. 学会等名 国立遺伝学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Nihsiyama
2. 発表標題 Impacts of cohesin ring conformation on the translocation and DNA replication
3. 学会等名 EMBO workshop Smc proteins (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Nihsiyama
2. 発表標題 Dynamics of cohesin at single-molecule resolution reveals cohesin-dependent chromatin structure
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Nihsiyama
2. 発表標題 Understanding cohesin dependent structural organization of DNA in single molecule resolution
3. 学会等名 Chromosome Dynamics 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoko Nishiyama
2. 発表標題 Impacts of cohesin ring conformation on the translocation and DNA replication
3. 学会等名 3C & 3R (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------