

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03160

研究課題名(和文) 姉妹染色分体間接着形成を司るコヒーシン複合体の作動原理研究

研究課題名(英文) Functional analysis of the cohesin complex that mediates sister chromatid cohesion.

研究代表者

村山 泰斗 (Murayama, Yasuto)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：60531663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂における染色体分配の正確性は、コヒーシンによって形成される複製された染色体の接着構造に依拠する。コヒーシンはリング構造のATPase複合体で、リング内にDNAを通すトポロジカルDNA結合を介して姉妹染色分体間接着を形成すると考えられているが、その分子機構は不明な点が多い。本研究は、精製したコヒーシンを用いてDNA結合反応を試験管内再構成し、特に補助因子ローダーによるコヒーシンの活性化機構について解析した。これにより、コヒーシンがDNA上でローダー複合体と高次複合体を形成し、またローダーが持つDNA結合活性を介してコヒーシンのトポロジカルDNA結合を促進するという機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報の担体である染色体の正確な分配・継承は全ての生物に必須であり、その要となる姉妹染色分体間接着の破綻は、染色体異常疾患や不妊等と密接に関連することが報告されている。本研究は、接着形成の本体であるコヒーシンについて、その機能の中核となるトポロジカルDNA結合反応を生化学的再構成により詳細に解析することで、接着形成初期段階の分子機構の一旦を明らかにした。本研究で得られた知見は、染色体研究分野を中心とした基礎研究の貢献に加え、ゲノム不安定性に由来するヒト疾患や機能不全の分子病態の理解に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Sister chromatid cohesion, physical connections between newly replicated chromatids mediated by the cohesin complex is vital for accurate chromosome distribution to daughter cells during cell division. Cohesin is a ring-shaped multisubunit ATPase assembly that topologically entraps DNA to mediate sister chromatid cohesion. Using biochemical reconstitution and yeast genetics, we showed that the loader forms a holo-complex with cohesin on DNA and promotes topological cohesin loading through its DNA binding activity. This study provides a mechanistic insight into the initial step of sister chromatid cohesion mediated by cohesin.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：染色体分配 姉妹染色分体間接着 コヒーシン 複製 試験管内再構成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製を経て倍加した染色体は、コヒーシンにより繋がれ、細胞分裂時まで互いに離れず接着している。この姉妹染色分体間接着は、分配装置である紡錘体が染色体を牽引する時に張力を形成する起点となり、娘細胞への正確な染色体分配を保障する。コヒーシンはリング構造の ATPase 複合体で、リングの中空に DNA を通すトポロジカル DNA 結合を介して接着を形成すると考えられている。接着に加え、コヒーシンはクロマチンループ構造の形成を介して、間期染色体のグローバルな構造を制御し、分化・発生に伴う遺伝子発現制御に密接に関与する。

コヒーシンの活性は複数の補助因子により制御される。まずローダーよりクロマチンにリクルートされ、DNA 複製に伴って接着を形成する。コヒーシンによる接着形成の分子機構を理解すべく、研究代表者らは精製した分裂酵母のタンパク質を用いて、コヒーシンの ATP 依存的な DNA 結合反応を試験管内再構成する系を構築した。これにより、1) ローダーはコヒーシンと直接結合し、ATP 依存的にトポロジカル DNA 結合を促進する、2) トポロジカル結合したコヒーシンは別の制御因子 Pds5-Wapl の働きにより能動的に DNA から脱離する、3) コヒーシンは単鎖 DNA 領域を介して、ATP 依存的に DNA-DNA 間の架橋を形成する、ことなどコヒーシンの生化学的な活性を示してきた (Murayama and Uhlmann, Nature 2014, Cell 2015, Murayama et al., Cell 2018)。コヒーシン自体の DNA 結合活性や補助因子の役割など、コヒーシンの ATP 依存的な DNA 結合活性については、そのあらましが判明しつつあるが、その詳細な分子機構、及び接着形成機構については解明すべきことが数多く残されている。

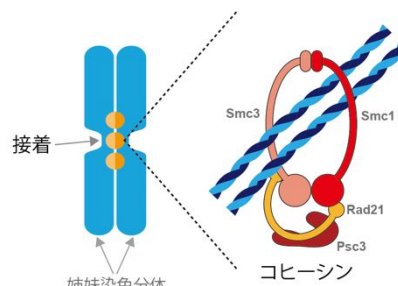


図 1 | 姉妹染色分体間接着とコヒーシン複合体

2. 研究の目的

本研究は、分裂酵母をモデルとし、コヒーシンの機能の中核であるトポロジカル DNA 結合反応の分子機構を明らかにすることを目的とした。研究代表者らは、これまでの研究でコヒーシン及びローダーはトポロジカル結合とは別に、静電相互作用を介した DNA 結合能があることを見出していた。これらの DNA 結合部位がトポロジカル結合の達成に機能すると考え、試験管内再構成実験を中心に分子機能解析を行った。

3. 研究の方法

コヒーシン及びローダーの変異・改変タンパク質を精製し、種々の生化学再構成実験により DNA 結合能について解析した。分裂酵母を用いて染色体局在解析を行い、再構成解析で得られた知見について細胞レベルで検証した。また、DNA に結合するコヒーシンの構造を明らかにするため、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) により可視化解析を行なった。

4. 研究成果

研究代表者らは、共同研究においてローダーの結晶構造を報告していた。この構造情報を元に、分裂酵母のローダー (Mis4) のホモロジーモデルを構築し、静電ポテンシャルとアミノ酸保存性を指標にローダーの DNA 結合部位を推定した。二箇所の候補部位について変異タンパク質を精製し解析を行なった (Site A と Site B と呼称)。まず長さの異なる DNA を基質とし、ゲルシフト法及び蛍光偏光解消法により解析したところ、Site A 及び Site B 変異ローダーでは DNA 結合が有意に低下し、Site A/B 二重変異ローダーでは DNA 結合が検出限界となった。一方、これらの変異ローダーはコヒーシンとの相互作用は野生型と差は見られなかった。これらの結果から、ローダーは Site A と B の二箇所を使い DNA に結合すると結論した。これらの変異ローダーを用いて、コヒーシンの DNA 結合の促進能について解析し以下の結果を得た。

- (1) コヒーシンのトポロジカル DNA 結合反応を再構成したところ、ローダー自身の DNA 結合活性と相関して促進能が低下していた。すなわち、Site A 及び Site B 変異ローダーでは部分的にコヒーシンのトポロジカル DNA 結合の促進が低下し、Site A/B 二重変異ローダーでは促進能が検出限界となった。この結果から、ローダーの DNA 結合活性はコヒーシンのトポロジカル DNA 結合の促進に必要であることが判明した。
- (2) これまでの研究から、コヒーシンのトポロジカル結合は、静電相互作用を介した DNA 初期結合がまず起こり、ATP 依存的な反応を経て達成されると予想された。そこで DNA 初期結合を特異的に検出する実験系を構築し、ローダーの DNA 結合活性が初期結合に必要なとされるか検証した。ローダー、及びコヒーシン単体は弱い初期結合を示したが、両方存在する場合はともに DNA 結合量が増加しており、ローダーとコヒーシンは DNA 上でホロ複合体を形成して安定した初期結合を行うことが示唆された。変異ローダーでは初期結合の安定性はローダーの DNA 結合能に相関して低下した。また、DNA 結合部位の一つに変異を入れたコヒーシンを用いた場合、コヒーシンの初期結合が相加的に減弱した。即ち、ローダーは自身

- の DNA 結合活性を介してコヒーシンの初期 DNA 結合を安定化し、その後の ATP 依存的なトポロジカル結合を促進することが示唆された。
- (3) コヒーシンはトポロジカルに DNA に結合した後、2 本目として単鎖 DNA と結合する活性を有することを以前に報告していた。この活性はコヒーシスが姉妹染色分体間接着を形成する経路の一つとして機能すると考えられる。この 2 本目の DNA との結合活性は、1 本目の結合と同様に、ATP とローダーに依存している。同定した DNA 結合変異ローダーを用いて生化学的に検証したところ、これら変異体では 2 本目との DNA 結合活性が減弱していた。即ち、ローダーはコヒーシンの ATP 依存的なトポロジカル結合に必須であり、2 本目の DNA 結合は 1 本目の結合と同様の原理で行われることが示唆された。
 - (4) 試験管内再構成解析の結果を細胞レベルで検証するため、同定した DNA 結合部位について分裂酵母細胞に同じ変異を導入し、クロマチン免疫沈降法によりコヒーシンのクロマチン局在を調べた。染色体腕部、ペリセントロメア、テロメア、rDNA 領域のいずれにおいても、野生株と比べ有意なコヒーシン結合の低下が見られた。

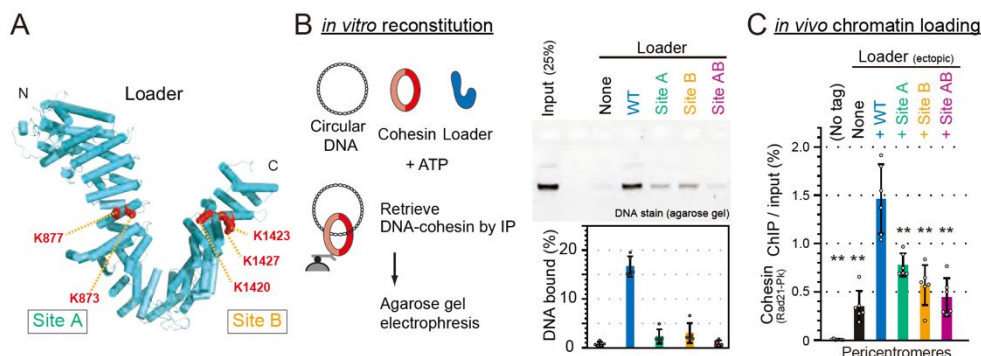


図 2 | ローダーは DNA 結合活性を介してコヒーシンの DNA ローディングを促進する。(A) ローダーの構造モデル。同定した DNA 結合部位は赤色で表示。(B) コヒーシンのトポロジカル DNA 結合の試験管内再構成。DNA 結合変異ローダーはコヒーシンの促進活性が低下した。(C) クロマチン免疫沈降法によりコヒーシンの染色体結合を定量した。ローダーの DNA 結合部位の変異によりコヒーシンのクロマチン結合が低下した。(adapted from Kurokawa and Murayama, Cell Reports, 2020, under the CC BY-NC-ND 4.0 license)

以上の結果は、コヒーシンとローダーは DNA 上でホク複合体を形成し、ローダーとコヒーシンがもつ複数の DNA 結合部位を協調的に使うことでトポロジカル DNA 結合を達成することを示唆している (Kurokawa and Murayama, Cell Reports, 2020)。

これに並行し、DNA に結合するコヒーシンの分子実像を明らかにするため、高速 AFM による可視化を試みた。環状 DNA を基質とし、反応チューブ内で ATP とローダー存在下で反応させた後に高速 AFM で観察した。野生型のコヒーシンを用いた場合、DNA と結合した分子は見られるものの、明確な結合構造の判定が困難であった。種々の実験から AFM ステージ上でコヒーシンが不安定であることが示唆された

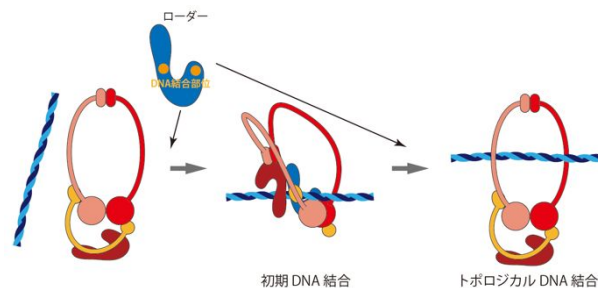


図 3 | ローダーによるコヒーシンローディング反応のモデル

ため、タンパク質部位特異的架橋法によりコヒーシンを安定化させ長時間観察を可能にする方法を構築した。これにより、ATPase 結合ドメインに結合する等数種の結合様式を可視化することに成功した。現在、ATPase 変異コヒーシンや ATP アナログを用いることで DNA 結合中間体の解析を進めているところであり、この解析法によりコヒーシンの DNA 結合反応の実像が解明されることが期待される。

また、DNA 複製時に起こるコヒーシンの姉妹染色分体間接着形成を再構成する目的で、出芽酵母の DNA 複製反応とコヒーシンの試験管内再構成系の構築を進めた。まず、精製した出芽酵母のタンパク質を用いて、DNA 複製の開始・伸長・終結までを一貫して行う試験管内再構成系を構築した。並行して、出芽酵母のコヒーシンとローダーを精製し、ATP 依存的なトポロジカル DNA 結合の再構成系を構築した。現在コヒーシンと複製反応を共役して行うために、反応条件を至適化しているところである。また、出芽酵母のコヒーシン再構成系を至適化する過程で、コヒーシンのトポロジカル DNA 結合を制御する新たな因子を発見した。これは新たな研究課題として今後解析していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Palihati Maierdan, Tsubouchi Hideo, Argunhan Bilge, Kajitani Rei, Bakenova Omirgul, Han Yong-Woon, Murayama Yasuto, Itoh Takehiko, Iwasaki Hiroshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Homology length dictates the requirement for Rad51 and Rad52 in gene targeting in the Basidiomycota yeast <i>Naganishia liquefaciens</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 919 ~ 936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-021-01201-3	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 -
1. 著者名 Muraszko Jakub, Kramarz Karol, Argunhan Bilge, Ito Kentaro, Baranowska Gabriela, Kurokawa Yumiko, Murayama Yasuto, Tsubouchi Hideo, Lambert Sarah, Iwasaki Hiroshi, Dziadkowiec Dorota	4. 巻 49
2. 論文標題 Rrp1 translocase and ubiquitin ligase activities restrict the genome destabilising effects of Rad51 in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6832 ~ 6848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab511	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 該当する
1. 著者名 Kentaro Ito, Yasuto Murayama, Yumiko Kurokawa, Shuji Kanamaru, Yuichi Kokabu, Takahisa Maki, Tsutomu Mikawa, Bilge Argunhan, Hideo Tsubouchi, Mitsunori Ikeguchi, Masayuki Takahashi, Hiroshi Iwasaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Real-time tracking reveals catalytic roles for the two DNA binding sites of Rad51	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 2950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16750-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yumiko Kurokawa, Yasuto Murayama	4. 巻 33
2. 論文標題 DNA Binding by the Mis4Scc2 Loader Promotes Topological DNA Entrapment by the Cohesin Ring	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aleksandar Zdravkovic, James M. Daley, Arijit Dutta, Tatsuya Niwa, Yasuto Murayama, Shuji Kanamaru, Kentaro Ito, Takahisa Maki, Bilge Argunhan, Masayuki Takahashi, Hideo Tsubouchi, Patrick Sung, and Hiroshi Iwasaki	4. 巻 118
2. 論文標題 A conserved Ctp1/CtIP C-terminal peptide stimulates Mre11 endonuclease activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 e2016287118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2016287118	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 該当する

1. 著者名 Bilge Argunhan, Masayoshi Sakakura, Negar Afshar, Misato Kurihara, Kentaro Ito, Takahisa Maki, Shuji Kanamaru, Yasuto Murayama, Hideo Tsubouchi, Masayuki Takahashi, Hideo Takahashi, Hiroshi Iwasaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Cooperative Interactions Facilitate Stimulation of Rad51 by the Swi5-Sfr1 Auxiliary complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e52566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.52566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 村山泰斗
2. 発表標題 高次染色体構造の形成を担うタンパク質複合体の構造と機能
3. 学会等名 日本遺伝学会 第93回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山泰斗
2. 発表標題 染色体構造の形成を担う Smc 複合体の機能と動態
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川裕美子、村山泰斗
2. 発表標題 Biochemical and structural characterizations of the chromosomal cohesin complex
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山泰斗
2. 発表標題 染色体接着を担うコヒーシン複合体の生化学的解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuto Murayama
2. 発表標題 Biochemical analysis of the fission yeast structural maintenance of chromosome complex
3. 学会等名 pombeTalks（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumiko Kurokawa, Yasuto Murayama
2. 発表標題 Replisome-associated Ch11 promotes cohesin-mediated DNA-DNA tethering by overcoming physiological protein blocks.
3. 学会等名 EMBO Workshop: Organization of bacterial and eukaryotic genomes by SMC complexes（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuto Murayama
2. 発表標題 The chromosomal cohesin complex: molecular insights from biochemical reconstitution
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuto Murayama
2. 発表標題 Interplay between cohesin and replisome-associated proteins for establishment of DNA-DNA interactions
3. 学会等名 The 8th International Symposium of Gunma University Initiative for Advanced Research(GIAR) satellite workshop ~ Genome Damage and Stability ~ (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://murayamalab-chromosomebiochem.jimdoofree.com

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
研究協力者	古寺 哲幸 (Kodera Noriyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	荒木 弘之 (Araki Hiroyuki)		

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