

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究(A)  
 研究期間：2009～ 2012  
 課題番号：21681025  
 研究課題名（和文） コヒーシンサブユニット SMC3 のアセチル化修飾動態の解析

研究課題名（英文） Analysis of the acetylation of SMC3

## 研究代表者

加藤 由起 (KATOU YUKI)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号：50391917

## 研究成果の概要（和文）：

姉妹染色分体間接着因子が、どのようにして S 期に複製と連動して染色体にロード、また確立されるのか、そのメカニズムを明らかにするために、姉妹染色分体間接着確立で中心的な役割を担っている Eco1 について ChIP-chip での解析を試みた。またアセチルトランスフェラーゼである Eco1 の主要なターゲットが Smc3 であることから、同様にアセチル化された Smc3 の結合分布の検出を出芽酵母で試みた。架橋剤などを試行錯誤したが、うまく働かず、最終的にはヒト細胞のアセチル化 Smc3 抗体を認識するよう出芽酵母の Smc3 部位を置き換え、アセチル化 Smc3 領域の検出に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

To understand how “sister chromatid cohesin” is loading onto chromosome or establish in S phase, I tried to analyze Eco1 using *S. cerevisiae*. Though I tried to know the distribution of Eco1 using ChIP-chip technique first, it was hard to detect distribution clearly. Next I tried to make improvements of ChIP-chip or ChIP-seq technique. At last we made strains which has the region of Smc3 is replaced into humanized Smc3. This strain can detect by human acetylated Smc3 antibody. Finally using these strains and antibody we can detect of the acetylation region of Smc3.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	896,595	268,979	1,165,574
2011 年度	2,303,405	691,021	2,994,426
2012 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：

染色体 ゲノム機能 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

コヒーシン（姉妹染色分体間接着因子）  
 は真核生物間で高度に保存された 4 つのタン

パク (Smc1, Smc3, Scc1, Scc3) から構成されるタンパク複合体で、遺伝情報の正確な分配のために必須の役割を担っている。すなわち、S 期に染色体 DNA が複製されると複製された領域に順次コヒーシンが結合し、姉妹染色分体間の接着が確立して行く。この接着は G2/M 期まで維持され、M 期に入ると共に、コヒーシンはセパレーズと呼ばれるタンパク分解酵素により主として除去される。コヒーシンの動態については主として酵母を中心として研究が進められていたが、実際に姉妹染色分体間接着の確立がどのように S 期と連動して図られているのかについては、極めて曖昧なデータしか存在していなかった。特に、大きな課題は姉妹染色分体間接着確立で中心的な役割を担っている Eco1 についてその局在動態を含めほとんど明らかではない点にある。しかしながらアセチルトランスフェラーゼである Eco1 の主なターゲットが Smc3 である事も明らかになり、Eco1 また Smc3 のアセチル化を解析する事により、姉妹染色分体間接着因子の確立と、また複製因子との相互関係を明らかに出来るものと期待出来た。

## 2. 研究の目的

本研究ではアセチル化 Smc3 の動態とそれを制御する遺伝子群の同定を行う。さらに ChIP-chip もしくは ChIP-seq 法を改良し姉妹染色分体間接着確立において最も重要である Eco1 タンパクの局在を解析可能系の構築などを通して、いつ、どこでどのような機構で姉妹染色分体間接着確立 (Smc3 のアセチル化) が誘導されるのか、また染色体分配の Smc3 の脱アセチル化による制御は存在するのか等、Smc3 のアセチル化修飾を中心として姉妹染色分体間接着確立の制御の全貌を明らかにする。

## 3. 研究の方法

この課題を始めるにあたって、局在を明らかにする為に ChIP-chip 法で Eco1 を試したみたが、明確な結果を得る事が出来なかった。原因として、Eco1 タンパクの量が少ない、Eco1 がホルマリンで DNA と架橋できるほど DNA の近傍にいない、Eco1 と DNA の相互作用が極めて一過的なものである等の可能性が考えられる。そこでまず ChIP-chip 法の検討を行う。具体的には 1) 架橋剤の検討 (特にホルマリンの架橋距離である 2Å に比べ長距離の架橋が可能な架橋剤である DTBP や EGS 等によりまずタンパク同士を架橋し、その後ホルマリン架橋をおこなう)、2) ホルマリンと反応性の高い新たなタンパクタグ配列の検討 (リジン、アルギニン残基を多く含む)、を行うなどを試みた。また当研究室で作成した出芽酵母の Smc3 のアセチル化サイトを認識する抗体を用いて、アセチル化された Smc3

の結合部位の同定を試みる。

## 4. 研究成果

アセチル化された Smc3 を認識する抗体を用い、Smc3 のアセチル化がどのような意義を持つのかを明らかにする事により、S 期におけるコヒーシンと複製の関連性の解明を目指した。この出芽酵母のアセチル化 Smc3 サイトを認識する抗体を用い、アセチル化 Smc3 の免疫沈降を行ったが、出芽酵母のアセチル化 Smc3 抗体では、免疫沈降を行う事が出来なかった。そこで、当研究室が所有する (ヒト細胞に対して) 免疫沈降にも使える事が明らかになっているヒト細胞のアセチル化 Smc3 サイトを認識する抗体の使用を試みた。そこで出芽酵母の Smc3 のアセチル化認識サイトをヒト細胞アセチル化 Smc3 抗体で認識出来るように、作り替えた株を作製し、ヒト細胞用アセチル化 Smc3 抗体を使用して免疫沈降を行った所、免疫沈降に成功した。そこで、このヒトアセチル化 Smc3 サイトを持つ株を使用して、ChIP-seq (illumina 社の Miseq を使用) を行い、アセチル化 Smc3 サイトの同定を試みた (図 1)。



図 1: G2 期に同調した細胞を用い、アセチル化 Smc3 の結合サイトを検出した。図は、横軸は出芽酵母第六染色体の左腕から右腕を示しており、縦軸はリード数を示している

図 1 のように、アセチル化 Smc3 を検出する系の確立の試みが軌道に乗り始めたので、この系を使用して細胞を G1 期に同調後、S 期の細胞を経時的にサンプリングを行い、Smc3 のアセチル化が S 期のどの段階で染色体のどの部分で起こるのか検出を試みた。低温度 (16 度) で細胞を同調することで、S 期の進行を遅らせ、より詳細に結合分布の観察を試みた (図 2)。さらに Smc3 抗体を用いることで、アセチル化されている、されていない領域の比較も試みている。

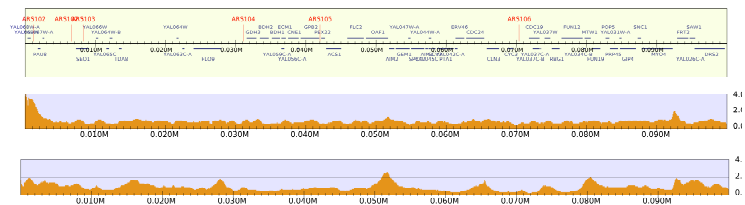


図 2: G1 期に同調した細胞をリリースし、S 期初期、後期の細胞を回収し、CHIP-Seq でアセチル化 Smc3 の結合部位を解析した。上から第一染色体の遺伝子位置 (上段)、S 期初期 (中

段)、S期後期(下段)のデータ。縦軸は免沈分画(IP)を各々の全分画(WCE)で割った濃縮度となっている。

これらの結果から、コヒーシスが染色体に結合すると同時期にアセチル化も起こっており、またアセチル化される Smc3 はある特定の部位のコヒーシスではなく、染色体腕部、セントロメアのコヒーシスの区別なくアセチル化されている可能性があることが明らかになった。

これらの結果より、複製のプロファイルと詳細に比較する事により、複製と姉妹染色分体間の連携について、明らかになるものと期待できる。

#### 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 15 件)

①De Piccoli G, Katou Y, Itoh T, Nakato R, Shirahige K, Labib K. Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases. *Mol Cell*. 45(5):696-704(2012) 査読有

②Davidson MB, Katou Y, Keszthelyi A, Sing TL, Xia T, Ou J, Vaisica JA, Thevakumaran N, Marjavaara L, Myers CL, Chabes A, Shirahige K, Brown GW. Endogenous DNA replication stress results in expansion of dNTP pools and a mutator phenotype. *EMBO J*. 31(4):895-907(2012) 査読有

③Tanaka S, Nakato R, Katou Y, Shirahige K, Araki H. Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Curr Biol*. 21(24):2055-63(2011) 査読有

④Hu B\*, Itoh T\*, Mishra A, Katou Y, Chan KL, Upcher W, Godlee C, Roig MB, Shirahige K#, Nasmyth K#. ATP hydrolysis is required for relocating cohesin from sites occupied by its Scc2/4 loading complex. *Curr Biol*. 21(1):12-24 (2011) (#Shared Corresponding Author) (\*Equally contributed author) 査読有

⑤Falbo KB\*, Alabert C\*, Katou Y\*, Wu S, Han J, Wehr T, Xiao J, He X, Zhang Z, Shi Y, Shirahige K, Pasero P, Shen X. Involvement of a chromatin remodeling

complex in damage tolerance during DNA replication. *Nat Struct. Mol Biol*. 16(11):1167-72(2009) (\*equally contributed authors) 査読有

⑥Bando M\*, Katou Y\*, Komata M, Tanaka H, Itoh T, Sutani T, Shirahige K. Csm3, Tof1, and Mrc1 form a heterotrimeric mediator complex that associates with DNA replication forks. *J Biol Chem*. 284(49):34355-65. (2009) (\*equally contributed authors) 査読有

⑦Tanaka H\*, Katou Y\*, Yagura M, Saitoh K, Itoh T, Araki H, Bando M, Shirahige K. Ctf4 coordinates the progression of helicase and DNA polymerase alpha. *Genes Cells*. 14(7):807-20(2009). (\*equally contributed authors) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 学会名: The 13th International Conference on Systems Biology、  
開催日、場所: August 19-23, 2012 in Toronto Canada

発表タイトル: Genome-wide Dynamic change of Cohesin and replication in yeast.

発表者: Yuki Katou, Ryuichiro Nakato, Katsuhiko Shirahige

②学会名: 日本分子生物学会年会

開催日、場所: December 07-10, 2010 in Kobe Japan

発表タイトル: 次世代シーケンサーを使用した姉妹染色分体間の接着形成に必要な因子の解析

発表者: 加藤由起、伊藤武彦、白髭克彦

③学会名: 日本分子生物学会年会

開催日、場所: December 09-12, 2009 in Yokohama Japan

発表タイトル: Csm3, Tof1, and Mrc1 form a Heterotrimeric Mediator Complex

that Associates with DNA Replication Forks  
発表者: 加藤由起、田中宏和、白髭克彦

〔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.iam.u-tokyo.ac.jp/chromosomeinformatics/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 由起 (KATOU YUKI)

東京大学 分子細胞生物学研究所 助教

研究者番号：50391917