

平成 23 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～ 2010  
 課題番号：21710192  
 研究課題名（和文） コヒーシンの転写制御における役割の解明

研究課題名（英文） Analysis of transcriptional regulation by Cohesin

研究代表者

坂東 優篤 (BANDO MASASHIGE)  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
 研究者番号：90360627

研究成果の概要（和文）：

コヒーシンサブユニット SMC3 コンディショナルノックアウト (SMC3KO) マウスを作製した。神経細胞特異的に SMC3 のヘテロノックアウトすると、神経細胞の維持ができず、細胞死が誘導される。現在、神経細胞分化段階で、時期を変えてノックアウトを行い、形態学的な影響とともに遺伝子発現変化、クロマチン高次構造解析を行うことを予定している。一方、SMC3 が、ESCO1/ESCO2 によりアセチル化されることと、その特異的な脱アセチル化酵素として HDAC8 を新たに見いだした。さらに HDAC8 が、今まで原因が特定されていなかった CdLS 遺伝病の原因遺伝子の一つであることが明らかとなった。これらの発見に加え、コヒーシンのアセチル化、脱アセチル化状態がダイナミックに変動しているという知見から、コヒーシンのアセチル化制御と転写制御との連携の可能性が考えられた。現在、ChIP-seq 解析法を用いて、染色体上での経時的なコヒーシンのアセチル化領域の変化について詳細に解析を進めるとともに、アセチル化の分子的意義について解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

I have developed a system to deplete SMC3, one of essential cohesin subunits, specifically in the neuron cells of mice. The neuron could not survive and cell death was induced. I am analyzing gene expression profile and chromatin high order structure at each stage of differentiation. Meanwhile I have identified HDAC8 as a specific deacetylase for SMC3 and causative gene for CdLS. These findings suggest that acetylation status of cohesin is also important for transcriptional regulation. I am now trying to analyze biochemical property of acetylated Smc3 and its genomic localization to understand the mechanism behind regulation of transcription by acetylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：若手研究(B)

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：ゲノム構造

## 1. 研究開始当初の背景

コヒーシンは、姉妹染色分体を分裂期まで接着させる役割を担うだけでなく、ヒトを含む高等真核生物では、分化し、増殖を停止した神経細胞等においてもコヒーシスが染色体上に存在することや、コルネリアデランゲ (CdLS) 症候群 (小頭症等の重度の精神遅延、四肢の形成異常、心臓の形成異常を伴う疾患) がコヒーシンあるいはそのローダーの変異が原因となる遺伝病であること、ショウジョウバエのコヒーシンローダー変異体の解析から、転写制御をコヒーシスが担っている可能性が示唆されていた。さらに、コヒーシスが、インシュレーター因子 CTCF と協調し、転写のインシュレーターとして機能することを報告した (Nature, 2008)。しかし、コヒーシスがどのように転写の制御を行っているのか、分子機構は未だ明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

ChIP-seq 法の確立および、Chromosome-Confomation Capture(3C)法を元に、染色体高次構造を次世代ハイスループットシーケンサーを用いた網羅的に解析可能な技術を確認することをまず目指す。また、確立した技術と分化細胞系を用いて、また、コヒーシンの転写への役割及び制御における分子メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)マウスの胎児脳から未分化神経細胞を取り出し、培養ディッシュ上で培養し、成熟神経細胞への分化、軸索、シナプス形成の分化培養系を確立する。

(2) ChIP-sequence 法の構築及びコヒーシンの結合領域の同定

ChIP-seq 法の構築は、培養細胞を用いてコヒーシン (Scc1 特異的な抗体は作製済) の ChIP を行い、コヒーシン結合 DNA を回収、次世代シーケンサーにより結合領域を同定する。

(3) 網羅的に染色体の高次構造を決定する手法の開発

網羅的に染色体高次構造を解析する方法は、既報の 3C(chromosome conformation capture)アッセイを元に構築を試みる。

(4)コヒーシンの制御機構の解析を細胞学的手法 (RNAi,免疫抗体蛍光染色法) 及び生化学的手法による解析を行う。

## 4. 研究成果

SMC3 コンディショナル KO マウスの作製及び解析 -SMC3 コンディショナル KO マウスから作製した SMC3 ホモノックアウトマウスは、

胎生致死であったのに対し、ヘテロノックアウトマウスの異常は、現在のところ観察されていない。一方で、Nestin プロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現する神経細胞特異的なノックアウト系では、脳部においてヘテロ、ホモとも SMC3 の欠損した細胞で細胞死が誘導されていた。現在、詳細な解析を行うとともに、さらに神経細胞の異なる分化段階でのコヒーシン欠損による影響について遺伝子発現やクロマチン状態変化を含め検討している。

一方で、コヒーシン SMC3 がアセチル化されることが報告され、SMC3 アセチル化抗体の作製及び解析を行った。SMC3 のアセチル化は ESCO1 と ESCO2 両因子によって引き起こされることを明らかにした。このアセチル化は、細胞周期を通じて起こり、アセチル化量は、S 期に高く、分裂期に低くなることが分かった。アセチル化量の細胞周期における変動は、脱アセチル化酵素の存在が推測され、スクリーニングを行った結果、HDAC8 を見いだした。HDAC8 のノックダウンや阻害は、アセチル化 SMC3 の増加を引き起こした。コヒーシン関連の遺伝子を原因する CdLS の遺伝病が知られており、この患者の症状は、転写の破綻により細胞の分化異常に起因することが知られている。CdLS の原因遺伝子として約 6 割占める遺伝子 nipbl が、RNA ポリメラーゼ II と直接作用することと一部の遺伝子の発現を抑制していることを見いだした。現在、この Nipbl タンパク質の染色体上の局在領域の同定を ChIP-seq 解析により進めている。また、原因遺伝子が特定されていない CdLS 患者の中に hdac8 遺伝子に変異を持つものが存在した。さらに、この患者由来の細胞は、コヒーシンのアセチル化の亢進と共にコヒーシン結合の変化が見られており、現在遺伝子発現変化との関係について調べている。

## 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 5 件)

1. Nishiyama T, Ladurner R, Schmitz J, Kreidl E, Schleiffer A, Bhaskara V, Bando M, Shirahige K, Hyman AA, Mechtler K, Peters JM, Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl, Cell, 査読有, 143, 2010, 737-749

2. Liu J, Zhang Z, Bando M, Itoh T, Deardorff MA, Li JR, Clark D, Kaur M, Tatsuro K, Kline AD, Chang C, Vega H, Jackson LG, Spinner NB,

Shirahige K, Krantz ID, Genome-wide DNA methylation analysis in cohesin mutant human cell lines, *Nucleic Acids Res.* 査読有, 38, 2010, 5657-5671

3. Bando 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* 査読有 284, 2009, 34355-34365.

4. Tanaka 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 to Cell*, 査読有, 14, 2009, 807 – 820

5. Liu J, Zhang Z, Bando M, Itoh T, Deardorff MA, Clark D, Kaur M, Tandy S, Kondoh T, Rappaport E, Spinner NB, Vega H, Jackson LG, Shirahige K, Krantz ID, Transcriptional Dysregulation in NIPBL and Cohesin Mutant Human Cells, *Pros Biology*, 査読有 7,2009, e1000119

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂東 優篤 (BANDO MASASHIGE)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：90360627