

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～ 2012

課題番号：23710213

研究課題名（和文） ESCO1 及び ESCO2 によるコヒーシニアセチル化の分子機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanism of cohesin acetylation by ESCO1 and ESCO2

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):ESCO1は、酵素ドメインを含まないN末領域にクロマチン及びPDS5に結合する領域が存在し、この結合を介してコヒーシンのアセチル化を行っていた。ESCO1の染色体上の局在は、腕部に存在するコヒーシンの結合領域と完全に一致し、その領域でアセチル化を引き起こしていた。一方、ESCO2は、S期のみが存在し、コヒーシニアセチル化をMCMを含む複製装置を介して行っており、ヒトにおいても、酵母やアフリカツメガエルと同様にESCO2による姉妹染色分体間の接着が複製進行と協調して起こることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): We found that Escol acetylates cohesin through its N-terminal interaction with Pds5. ChIP-seq analysis of ESCO1 showed that it co-localizes with cohesin throughout the cell cycle. On the other hand acetylation of cohesin by ESCO2 requires Mcm helicases. Thus Escol in human, just like Eco1 in yeast, seems to establish sister chromatids cohesion during DNA replication progression.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

コヒーシンは、真核生物の間で高度に保存されている4つのサブユニットから構成されている複合体で名前の通りDNA複製後の倍加した染色体を分裂期まで束ねておく役割(姉妹染色分体間接着の役割-コヒージョン形成)以外にも、高等真核生物では、発生や分化過程における遺伝子発現制御に関与することが報告されている。私は、ゲノム上のコヒーシタンパクの局在を網羅的に明らか

にする手法(ChIP-chip解析)によりヒトコヒーシスが、1)染色体上でインシュレーター因子CTCFと共局在すること、2)CTCFと共に実際にインシュレーターとして機能すること、3)ヒトにおけるコヒーシン関連疾患であるCdLS(Cornellia de Lange症候群)では、ゲノム上のコヒーシン結合部位の約4割が失われていること、4)これらのコヒーシン病患者の中では、失われたコヒーシン結合部位の近傍の遺伝子の発現が上昇する傾向が

あること、を示し、コヒーシンの転写制御における役割をその分子実体と共に世界に先駆けて提示した。しかし、どのようにして転写機能を発揮しているのかその分子メカニズムは明らかにされていない。また、最近コヒーシンサブユニットの一つである SMC3 がアセチル化され、このアセチル化は姉妹染色分体間接着に必須であることが判明した。このアセチル化は、ヒトでは二種類のアセチル化酵素 ESCO1 と ESCO2 により引き起こされる。しかし、なぜ二種類の酵素が存在するのか、また二種類の酵素がどのようにコヒーシンをアセチル化するのか詳細な分子機構は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ESCO1 と ESCO2 自身の活性制御機構について明らかにし、これら酵素によるコヒーシンのアセチル化がどのように引き起こされるかその分子機構を解明する。この解明により2つの酵素の生理的な役割及びコヒーシンアセチル化による姉妹染色分体間接着及び転写の分子機能について迫る。

3. 研究の方法

本研究では、ESCO1、ESCO2、二つのアセチル化酵素の役割分担に焦点を当て、それぞれの Esco が構成する複合体の機能動態を解明すると共に、Smc3 のアセチル化修飾のインシュレータ、姉妹染色分体間接着構築における分子機能を解明することを目指す。そのため、まず、ESCO1/2 が、それぞれどのようなタンパク複合体を形成するのか？、また、そのアセチル化活性には基質特異性はあるのか？、あるとすれば、何が特異性を決めるのか？、を解析する。手法としては、まず、Esco がどのような因子と相互作用するのか、生化学的手法および遺伝学的手法を用い、タンパクの同定を行う。解析で複合体形成が明らかとなったタンパクについてはノックアウト実験を系統的に行ない、姉妹染色分体間接着への影響、インシュレーター活性や転写への影響、Smc3 のアセチル化への影響、をそれぞれ検証し、各蛋白の染色体分配、インシュレーター構築への寄与を検証する。さらに、Esco1/2 の基質特異性について、アセチル化 Smc3 が含まれるコヒーシン複合体の構成を、Esco1/2 それぞれのノックアウト条件下で解析し、複合体構成を比較することで明らかにする。これらの解析結果を統合し、2つのアセチル化酵素がそれぞれどのように役割分担を行ない、分配と転写というコヒー

シンの二つの機能を制御しているかを解明する。

4. 研究成果

ESCO1 は、コヒーシンサブユニット PDS5A 若しくは PDS5B に依存して SMC3 をアセチル化することを明らかにした。実際、昆虫細胞内で両因子を発現すると、PDS5 及び ESCO1 の直接的な相互作用が見られた。さらに、断片化および変異タンパクの解析から、PDS5 結合に必要な結合領域 (300-320 アミノ酸) を見いだした。また、それより N 末側 1-200 アミノ酸に ESCO1 がクロマチンの結合に必要な領域が存在した。この領域は、細胞核画分に含まれるコヒーシンのアセチル化に必須であった。

ESCO1 によるコヒーシンのアセチル化は、G 期から G2 期を通して起こる。一方、コヒーシンのアセチル化が他の細胞周期に比べ低くなる分裂期では、ESCO1 は、CDK1 及び AuroraB によりリン酸化されることを明らかにした。また、AuroraB は、ESCO1 の 302 番目のセリン残基をリン酸化していた (図 1)。この残基は、PDS5 との相互作用領域に含まれており、分裂期のコヒーシンの低アセチル化の維持に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

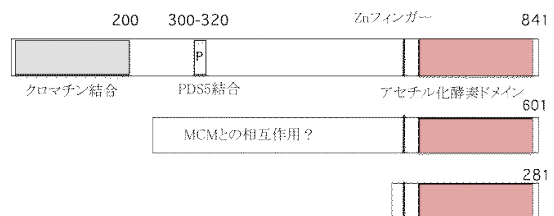


図 1. ヒト ESCO1 (上) と ESCO2 (下) 及び出芽酵母 Eco1 タンパク質の構造。P は、AuroraB による同定したリン酸化サイト。ESCO1 及び ESCO2 は Eco1 に比べ長い N 末の領域をもつ。

ESCO1 の ChIP-seq 解析から、染色体上の ESCO1 局在領域を 8658 カ所同定した。この領域のほとんどすべてコヒーシンの局在領域と一致した (図 2)。また、SMC3 アセチル化の ChIP-seq 解析から同定されたコヒーシンのアセチル化領域は、ESCO1 のノックダウンによりほとんど消失した。このことは、ChIP-seq 解析で検出されるユニークな領域 (繰り返し配列やセントロメア以外) のコヒーシンアセチル化は、ESCO1 により行われている可能性を示しており、ESCO1 と PDS5 の直

接的な相互作用を示すのと一致している。一方で、PDS5 結合領域とは別にクロマチン結合領域が存在することから、コヒーシン結合領域に存在するコヒーシン以外の ESCO1 結合因子に興味をもたれる。ESCO1 ノックダウンは、実際姉妹染色分体の接着の阻害もする一方で、転写に対しても影響を及ぼす結果が得られており、転写に関係する因子との相互作用があるのかもしれない。

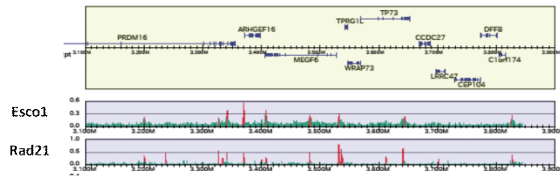


図2. ESCO1 及びコヒーシンの ChIP-seq 解析
GFP-ESCO1 を発現した HeLa 細胞を GFP 抗体を用いて ChIP-seq 解析を行った。

一方で、ESCO2 によるコヒーシンのアセチル化及び姉妹染色分体間の接着は、PDS5 を介さないものであった。しかし、S 期にのみ発現し、機能する ESCO2 は、DNA 複製因子 Orc1 や Cdc6 のノックダウンによる解析から、コヒーシンのアセチル化及び姉妹染色分体間接着にこれら因子を介して行っている結果が得られた。また、実際 ESCO2 を免疫沈降すると、複製フォークを構成する Mcm が得られた。ESCO2 の ChIP-seq 解析を行った結果から優位に認められる結合領域は得られなかった。また、ESCO2 のノックダウン実験とコヒーシンのアセチル化 ChIP-seq 解析では、ESCO1 とは対照的に優位なアセチル化領域の減少は見られなかった。これらの結果は、ESCO2 が、セントロメアなどに存在するコヒーシンや複製進行と協調して行われるコヒーシンをアセチル化しているため、現時点では同定及び検出感度の問題で捉えることが出来ないと考える。しかし、ヒト ESCO2 も、酵母やアフリカツメガエルなどで言われているように、DNA 複製と協調してコヒーシンのアセチル化及び姉妹染色分体間接着に機能していることが示唆された。

以上の結果から、ESCO1 及び ESCO2 は、細胞周期の異なる時期と異なる制御を受けていることを明らかにした。ESCO1 は、G1 から G2 期を通してコヒーシンを調節することで染色体構造を制御し、転写や姉妹染色分体の接着に寄与している。また、ESCO2 は、複製装置を通してコヒーシンに作用し、姉妹染色

分体間の接着に寄与している。今後は、本研究で見つけた変異タンパク質を用いてさらに詳細に解析をすすめることで、コヒーシン機能の新たな分子メカニズム解明への展開が期待出来る。

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 3 件)

1. Suzuki T, Ota Y, Ri M, Bando M, Gotoh A, Itoh Y, Tsumoto H, Tatum PR, Mizukami T, Nakagawa H, Iida S, Ueda R, Shirahige K, Miyata N, Rapid discovery of highly potent and selective inhibitors of histone deacetylase 8 using click chemistry to generate candidate libraries., J Med Chem. 2012, 55, :9562-9575. 査読有
2. Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, Saitoh K, Komata M, Katou Y, Clark D, Cole KE, De Baere E, Decroos C, Di Donato N, Ernst S, Francey LJ, Gyftodimou Y, Hirashima K, Hullings M, Ishikawa Y, Jaulin C, Kaur M, Kiyono T, Lombardi PM, Magnaghi-Jaulin L, Mortier GR, Nozaki N, Petersen MB, Seimiya H, Siu VM, Suzuki Y, Takagaki K, Wilde JJ, Willems PJ, Prigent C, Gillessen-Kaesbach G, Christianson DW, Kaiser FJ, Jackson LG, Hirota T, Krantz ID, Shirahige K., HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle., Nature. 2012, 489 :313-317. 査読有
3. Higashi TL, Ikeda M, Tanaka H, Nakagawa T, Bando M, Shirahige K, Kubota Y, Takisawa H, Masukata H, Takahashi TS. The prereplication complex recruits XEco2 to chromatin to promote cohesin acetylation in Xenopus egg extracts. Curr Biol. 2012 22, :977-988. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

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