

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290065

研究課題名(和文) コヒーシニアセチル化制御ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory network of cohesin acetylation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトでは2つのコヒーシニアセチル化酵素、Esco1、Esco2の存在が知られているが、其々の役割については不明である。Esco1はコヒーシンサブユニットPds5と直接結合し、この結合が染色体上のコヒーシンへの局在とアセチル化に重要であることを示した。さらに、分裂期のEsco1のリン酸化がPds5との結合を阻害することを示した。また、Esco2は、Esco1とは別の経路を介し、DNA複製因子Mcmとの相互作用が活性化に必要であることを示した。一方で、複製後の分裂期やG1初期には、Esco2はCul4依存のコピキチン-プロテアソーム経路により積極的に分解され、活性が抑制されることを示した。

研究成果の概要(英文)：There are two cohesin acetyl transferase, Esco1 and Esco2, in human. Both of them are essential for establishment of sister chromatids cohesion. We found that Esco1 directly binds to cohesin subunit Pds5 and co-localizes with cohesin. The domain for binding with Pds5 is responsible for cohesin acetylation and cohesion establishment. Esco1 phosphorylated in mitosis prevents its binding with Pds5. Therefore phosphorylation may have important role in controlling Esco1 localization. Esco2 associates with MCM helicases during G1 to S-phase. The N-terminal domain of Esco2 conserved among vertebrates is required for direct interaction with MCM. It has been known that Esco2 is down-regulated from late G2 to M phase. Interestingly Esco2 mutant that is unable to bind to Mcm is destabilized. This destabilization of Esco2 is caused by proteasome pathway mediated by Cul4 ligase. Thus, Esco1 and Esco2 function in different pathway from each other to promote cell cycle progression.

研究分野：ゲノム構造

キーワード：コヒーシン アセチル化 Esco 姉妹染色分体間接着 DNA複製 MCMヘリカーゼ

1. 研究開始当初の背景

コヒーシンは、リング状の特徴的な構造をとり、DNA 複製後の姉妹染色分体間の接着(コヒージョン形成)の機能に役割を担っている。一方で、コヒーシン関連の遺伝病コルネリア・デ・ラング症候群(CdLS)などの研究知見から、転写制御への寄与が昔から指摘されてきた。以前に、ヒトコヒーシンは、インシュレーター因子 CTCF と共局在し、転写のインシュレータ機能の一端を担う事や、CdLS 細胞ではコヒーシンの結合部位の減少とそれに伴った転写の脱抑制が見られる事を報告した。最近、転写活性化時に、コヒーシンが DNA のループ構造を通じた染色体高次構造形成やエンハンサーとプロモーター間の立体的な相互作用に関与することが示された。しかし、コヒーシンがどのような制御の元に、どのような機構で染色体の高次構造調節にかかわるのかそのメカニズムについては不明である。最近、コヒーシンの接着機能に必須であるアセチル化修飾が報告され、申請者は、このアセチル化の特異的な抗体を作製し、解析を始めた。その結果、コヒーシンのアセチル化にヒトでは ESCO1 と ESCO2 の二種類のアセチル化酵素が機能すること、その脱アセチル化は HDAC8 により触媒される事、さらに HDAC8 変異が CdLS の発症の原因の一つになっていることを発見した。コヒーシンのアセチル化は、S 期のみならず G0/G1 期に存在すること、また ESCO2 が四肢形成異常が高頻度に見られる Roberts 症候群の原因遺伝子であることから転写調節にも関与することが示唆されている。ESCO1 と ESCO2 は機能する染色体領域に特異性があると考えられており、ESCO1 と ESCO2 がアセチル化を触媒する為の必要条件は異なると考えられている。構造的に、両因子の C 末側は保存されたアセチル化触媒領域が、N 末側は染色体との直接的あるいは間接的な結合に必要な領域が存在し、この領域の機能的差が両者の特異性を発揮するのに重要である。しかしながら、両酵素の制御及びその動態については解析が未着手の状態であり、コヒーシンアセチル化の分子機構も含め、それぞれの酵素の役割についても不明である。一方、コヒーシンの脱アセチル化を触媒する HDAC8 は、遺伝子発現抑制に作用するヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 と同じファミリーに属するが、HDAC8 の脱アセチル化酵素としての活性がどのように制御されているのか、また基質となるコヒーシンにどのような特異性があるのかなど、その機能および制御については不明な部分が多い。

2. 研究の目的

本研究は、コヒーシンアセチル化修飾を制御する酵素 ESCO1、ESCO2、HDAC8 自身が、細胞内でどのように活性が制御され、コヒーシンをアセチル化するか、その詳細な分

子機構を明らかにする。また、アセチル化されたコヒーシンは、姉妹染色分体間接着および転写調節機能においてどのように働くのかを解明する。このような解析から、なぜコヒーシンの同一の部位をアセチル化する酵素が2種類存在するのか、その生理的意義と、アセチル化制御によるコヒーシンの機能発揮の分子機構の全体像の解明を目指す。

3. 研究の方法

ESCO1、2 及び HDAC8 が、どのような因子と相互作用するのか、質量分析装置やウェスタンブロットにより相互作用する因子を探索する。様々な状況下で3つの酵素が何か修飾を受けるか、修飾部位について質量分析装置や変異タンパク解析を用いて同定する。コヒーシンのアセチル化修飾を触媒する酵素活性を測定可能な *in vitro* 系をそれぞれの酵素について構築する。この系を用い、1)、2)に同定した相互作用候補因子の量的変化、タンパク修飾部位の変異が酵素活性に与える影響を検証する。

活性に影響を与えた相互作用因子、修飾について、細胞周期や増殖刺激の有無による量的変動の測定、ゲノム上の動態変化を ChIP-seq により明らかにする。さらに、相互作用因子の量的変動や酵素の修飾部位の変異が、ゲノム上のアセチル化コヒーシン、コヒーシン、RNA ポリメラーゼの局在に与える影響、姉妹染色分体間接着に与える影響を測定する。最終的に、アセチル化制御によるコヒーシンの分子機能制御機構の全貌の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) Escp1 と Pds5 との直接的な相互作用の同定

Escp1 は、分裂期を除く細胞周期を通じて存在し、SMC3(K105,K106 番目)をアセチル化する。一方で、Escp2 は、主に S 期に存在し、コヒーシンをアセチル化する。コヒーシンの制御サブユニットとして知られる Pds5 は、酵母ではコヒージョンの形成に重要である。ヒトでは、Pds5 には、Pds5A と Pds5B の二種類の存在する。Escp と Pds5 の関係性について検証するため、RNAi 法により Escp と Pds5 を組み合わせたノックダウン(KD)で、コヒーシンのアセチル化量の定量を行った。その結果、Pds5A/B と Escp2 両者 KD は、Escp1 と Escp2 両者 KD と同程度、アセチル化が阻害され、Pds5A/B と Escp1 は同様な傾向を示した。さらに、昆虫細胞内で、Pds5A もしくは Pds5B は、Escp1 を発現すると直接結合することが明らかとなった。さらに、Escp1 の断片化タンパク及び変異タンパクの相互作用実験より、Pds5 との結合に必要なドメインを決定し、Pds5 と結合できない変異タンパク(302-304 A 変異型)の作製に成功した。

(2) Escol1 によるコヒーシンのアセチル化と染色体局在への Pds5 の関与

Escol1、Pds5A、Rad21 の ChIPseq により染色体動態の解析を行った。Escol1 は、コヒーシンの結合する領域への局在が観察された。その局在は、Pds5KD や Pds5 非結合変異型 Escol1 では解消され、このとき、コヒーシンのアセチル化とコヒージョンの形成は抑制された。このことから、Pds5 が Escol1 のコヒーシンへの限局するのに働き、アセチル化を促進していることが示された。一方で、Escol1 のクロマチンへの結合自体は、影響されなかったことから、別の因子が必要であることが分かった。

(3) Escol1 の分裂期におけるリン酸化修飾部位の同定とその意義の考察

Escol1 は、分裂期になると、AuroraB キナーゼによるリン酸化されることを明らかにした。分裂期の Escol1 を精製し、リン酸化部位を同定すると、複数見つかり、その中に Pds5 と結合するドメイン内の S302 がリン酸化されていた。Escol2 の S302 にリン酸化型変異を導入すると、Pds5 の結合と、コヒーシン結合領域への局在が阻害された。このことから、prophase におこるコヒーシン乖離と同時に、Escol1 のリン酸化され、コヒーシンへのアセチル化効果を抑制している可能性が考えられた。

(4) Escol2 と Mcm ヘリカーゼとの相互作用と安定性

Escol2 タンパクビーズと DNase 処理した細胞破砕液を混合反応させ、Escol2 と Mcm の結合をより直接的な方法で捉えた。このとき、アフリカガエル Eco2 で DNA 複製前複合体との結合に必要なドメインと相同性の高い領域に変異を導入し、同様の系で Mcm ヘリカーゼとの結合能を検証すると、結合が阻害された。しかし、Mcm と結合できない変異 Escol2 は、細胞に発現すると不安定化し、この不安定化は、プロテアソーム阻害剤処理により抑制された。また、Mcm の構成因子を KD すると、Escol2 が減少し、不安定化することを示した。このように、ヒト Escol2 が Mcm 複合体と直接結合する可能性を初めて示し、この結合は、Escol2 のタンパクの安定性を維持し、活性化に重要であることを明らかにした。今後は、Escol2 と Mcm の相互作用は、どのように促進されるか、その制御機構の解明が重要となる。Escol2 は、複製開始前より Mcm と相互作用することが捉えられていることから、複製開始に必要な複製伸長因子や CDK1 の活性とは異なる新たな要因が考えられる。

(5) Cul4 リガーゼを介したユビキチン-プロテアソーム経路による Escol2 の分解

Escol2 の活性化は、Mcm との結合が重要で、DNA 複製が終了した後の分裂期や G1 期初

期では、Escol2 量が極端に減少する。この減少は、プロテアソームに依存した積極的な分解により引き起こされていた。この分解には、Cul4 ユビキチンリガーゼ複合体の関与を明らかにした。今回、Escol2 を分解するユビキチンリガーゼを新たに同定した。そのため、さらに、Escol2 と直接相互作用する基質認識に必要な因子を容易に同定することが可能となる。

(6) Escol1 と Escol2 及びアセチル化コヒーシンの染色体動態の解析

内在のタンパクを認識する抗体が使用できなかったため、タグ融合の Escol1 と Escol2 の発現細胞を用いて、ChIPseq 解析により染色体動態を試みた。Escol1 の染色体上の局在は、コヒーシンの局在とほぼ一致していた。この局在は、細胞周期の時期に応じた変化はなく、細胞周期による制御はないように考えられた。さらに、コヒーシンのアセチル化の局在量と局在数は、Escol1 のノックダウンにより大きく減少し、ChIPseq 解析で捉えたほとんどのコヒーシンのアセチル化の局在は、Escol1 に依存したものであった。同様に Escol2 を ChIPseq で解析すると、同定できた局在数及び量は Escol1 と比較し少なかった。この同定された領域に Escol1 と Escol2 の一致する領域が存在し、この領域のコヒーシンは強くアセチル化されていた。続いて、Escol2 の ChIPseq を、幅広い領域を一区画として改めて統計解析すると、ヘテロクロマチンを示す領域(HP1 や H3K9me3)に局在を示すデータが得られた。このような領域では、Escol2 をノックダウンすると、同様な解析で見られたコヒーシンやアセチル化コヒーシンの局在が抑制されていた。以上の結果から、これまでの ChIPseq 解析で観察されるアセチル化コヒーシンの局在のほとんどは、Escol1 に依存して起こる。では、Escol2 はどのようなコヒーシンをアセチル化するのか、おそらく、従来通りの解析では見えてこなかった領域が標的となりアセチル化している可能性が得られた。これまで、言われてきたヘテロクロマチンやセントロメアなどの領域にあるコヒーシンのアセチル化に関与していることが予想される。本結果は、N 末に GFP タグをつけた Escol2 で解析を行った。より正確に結果を評価、検証するため、さらなる実験が必要となる。

(7) Escol1 と Escol2 の機能的な相違と意義

これまでの結果から、Escol1 は、Pds5 を介してコヒーシンに作用すること、一方で、Escol2 は、Mcm 複合体を介してコヒーシンに作用することでコヒーシンをアセチル化し、コヒージョンが形成される。コヒージョンの形成には、Sororin が必須であるが、興味深いことに Escol2 によるアセチル化したコヒーシンには、Sororin が安定に結合しない。また、Sororin が欠損していると、Escol2 によりア

セチル化されたコヒーシンは、安定に維持できず、脱アセチル化されてしまう。このように、Esco2 と Sororin の機能的な連携が、コヒーシンの形成には非常に重要であることが分かった。

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 7 件)

Sutani T, Sakata T, Nakato R, Masuda K, Ishibashi M, Yamashita D, Suzuki Y, Hirano T, Bando M, Shirahige K. Condensin targets and reduces unwound DNA structures associated with transcription in mitotic chromosome condensation. *Nat Commun.* 6 7815. (2015) 査読有 doi: 10.1038/ncomms8815.

Minamino M, Ishibashi M, Nakato R, Akiyama K, Tanaka H, Kato Y, Negishi L, Hirota T, Sutani T, Bando M, Shirahige K., Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2., *Curr Biol.* 25 1694-1706 (2015) 査読有 doi: 10.1016/j.cub.2015.05.017. Epub 2015 Jun 4.

Izumi K, Nakato R, Zhang Z, Edmondson AC, Noon S, Dulik MC, Rajagopalan R, Venditti CP, Gripp K, Samanich J, Zackai EH, Deardorff MA, Clark D, Allen JL, Dorsett D, Misulovin Z, Komata M, Bando M, Kaur M, Katou Y, Shirahige K, Krantz ID. Germline gain-of-function mutations in AFF4 cause a developmental syndrome functionally linking the super elongation complex and cohesin., *Nat Genet.* 47 338-344 (2015) 査読有 doi: 10.1038/ng.3229. Epub 2015 Mar 2.

Komata M, Katou Y, Tanaka H, Nakato R, Shirahige K, Bando M, Chromatin Immunoprecipitation Protocol for Mammalian Cells., *Methods Mol Biol.* 1164 33-38 (2014) doi: 10.1007/978-1-4939-0805-9_4.

Suzuki T, Muto N, Bando M, Itoh Y, Masaki A, Ri M, Ota Y, Nakagawa H, Iida S, Shirahige K, Miyata N, Design, synthesis, and biological activity of NCC149 derivatives as histone deacetylase 8-selective inhibitors. *ChemMedChem.*, 9, 657-664 (2014) 査読有 doi: 10.1002/cmdc.201300414. Epub 2014 Jan 8.

Gallego-Paez LM, Tanaka H, Bando

M, Takahashi M, Nozaki N, Nakato R, Shirahige K, Hirota T., Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to chromosome assembly during mitosis in human cells., *Mol Biol Cell.*, 25 302-317 (2014) 査読有 doi: 10.1091/mbc.E13-01-0020. Epub 2013 Nov 20.

Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S., Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms., *Nat Genet.* 45:1232-1237 (2013) 査読有 doi: 10.1038/ng.2731. Epub 2013 Aug 18.

〔学会発表〕(計 4 件)

Masashige Bando,
The role of cohesin and cohesin loader in transcriptional regulation.,
EMBO workshop 'SMC protein'
Vienna, Austria 2015年5月12日-5月15日

Masashige Bando,
The role of cohesin loader in transcriptional regulation.,
The 4D nucleosome 2014 2014年12月17日-12月20日 広島

坂東優篤,
転写調節におけるコヒーシンローダーの機能解析.,
日本分子生物学会第38年会 2014年11月29日-12月2日 横浜

Masashige Bando.,
Interacting networks of cohesin and cohesin loader.,
Cohesin Biology and the Cohesionopathies, Siena, Italy 2013年7月12日-7月15日

〔図書〕(計 1 件)

坂東優篤、秋山和弘、白髭克彦
細胞工学 学研メディカル秀潤社
染色体工学 Update 2015vol.34.11月

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

(2) 研究分担者

中戸 隆一郎 (NAKATO, Ryuichiro)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：60583044

(3) 連携研究者

なし