

52. コヒーシンの依存的な染色体機能制御機構の解析

西山 朋子

*名古屋大学 高等研究院

Key words : 姉妹染色分体間接着, コヒーシン, クロマチン, 一分子観察

緒言

姉妹染色分体間接着を担うコヒーシン複合体は、真核生物の間でひろく保存されたリング状のタンパク質複合体で、ATPaseであるSmc1とSmc3、kleisinサブユニットのScc1、Scc1に結合するSA1/2のヘテロ四量体から形成される(図1B) [1](#)。コヒーシンのリングはDNA複製依存的に、2本のDNAを繋ぎ止めることで接着を確立することが知られているが、一方で、コヒーシンサブユニットやその結合因子、修飾因子が、コルネリア・デ・ランゲ症候群(CdLS)をはじめとした遺伝性疾患(「コヒーシン病」)の原因遺伝子であることが近年明らかになっている。コヒーシン病では複数のサブユニットに変異が同定されており、それらの変異は、四肢形成不全や精神発達遅延など多様な症状を伴う疾患の原因となっている [2](#)。これまでの研究から、CdLSは遺伝子発現制御の異常に起因する可能性が示唆されているが、遺伝子が入り組んだ複雑なクロマチン環境中で、個々のコヒーシンの動態に関する知見が欠如していることから、接着に必須であるコヒーシンがどのように遺伝子発現と関連し得るのか、その分子メカニズムの理解には至っていない。そこで本研究では、独自に開発したコヒーシン複合体一分子観察系を用い、DNAおよびクロマチン上のコヒーシンダイナミクスを一分子レベルで観察し、そのダイナミクスがクロマチン環境やコヒーシン結合因子・修飾因子等によってどのような作用を受けるかを解析することで、コヒーシン動態に関する知見を集め、コヒーシン病発症のしくみを分子レベルで理解することを目指した。

方法

本研究では、DNA およびクロマチン上でのコヒーシ分子の挙動を観察するための系を構築した (図 1)。

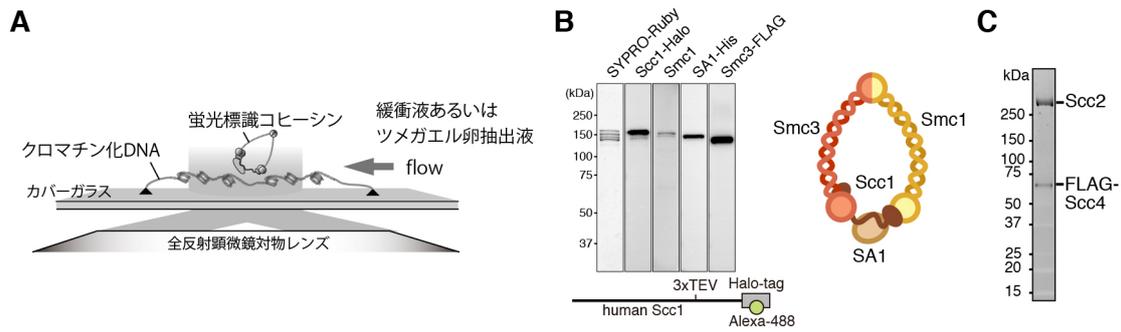


図 1. コヒーシ分子観察系の構築

(A) 全反射顕微鏡を用いた一分子観察系。カバーガラス上に 50kb 長の λ DNA の両端を繋留し、naked DNA を観察する場合は緩衝液、クロマチンを形成させる場合はツメガエル卵抽出液を流した。(B) ヒトのコヒーシ複合体 (Scc1・Smc1・SA1・Smc3) は昆虫細胞 Sf21 を用いて発現・精製し、Scc1 に付加した Halo タグを蛍光色素 Alexa488 で標識した。(C) コヒーシ複合体は Scc2-Sc4 を用いて DNA 上にロードさせた。Scc2-Sc4 複合体はヒト培養細胞で発現・精製した。

厚さ 100 nm、幅 2 mm のフローチャンバーを作製し、チャンバー内で、カバーガラス上に長さ 50 kbp の λ DNA の両端を、引き伸ばした状態で繋留させた。これを全反射顕微鏡にセットし、フローチャンバーの outlet 側を微量な液体を吸引できるシリンジポンプにつなぎ、inlet 側に流したい緩衝液や細胞抽出液をセットした。ツメガエル卵抽出液を流すことで、繋留された DNA はヌクレオソームを形成することができる。観察に用いたコヒーシは、ヒトのコヒーシ複合体 (Smc1-Smc3-Scc1-SA1 からなる四量体：図 1B 右) をくみこんだバキュロウイルスを昆虫細胞 Sf21 に感染させ、発現、精製した。Scc1 の C 末端に付加した Halo タグを蛍光色素 (Alexa Fluor 488) で標識した。リング状のコヒーシ複合体が DNA を囲い込むようにして結合 (トポロジカル結合) するためには、コヒーシローディング因子 Scc2-Sc4 複合体が必要である。Scc2-Sc4 複合体は、ヒト培養細胞において発現・精製した。

結果および考察

1. コヒーシは DNA 上において次元自由拡散運動を示す

はじめに、コヒーシがクロマチン化されていない naked な 2 本鎖 DNA 上でどのような挙動を示すかを観察した (図 2)。Scc2-Sc4 複合体依存的に DNA にトポロジカルに結合させたコヒーシは、DNA 上をランダムに運動し、その動きは自由拡散運動であると判定された。コヒーシは Smc1 および Smc3 サブユニットのヘッドドメインに ATP 加水分解活性を持っているが、ATP 非存在下においても同様の運動を示したことは、この動きが拡散運動であることを支持している。しかしながら ATP 非加水分解型アナログである AMP-PCP 存在下でコヒーシの動きが顕著に抑制された。AMP-PCP は Smc1-Smc3 ヘッドドメイン同士の解離を抑制するため、コヒーシリングが物理的に閉じた状態になることが、コヒーシの拡散運動に対して阻害的に働いている可能性が示唆された。

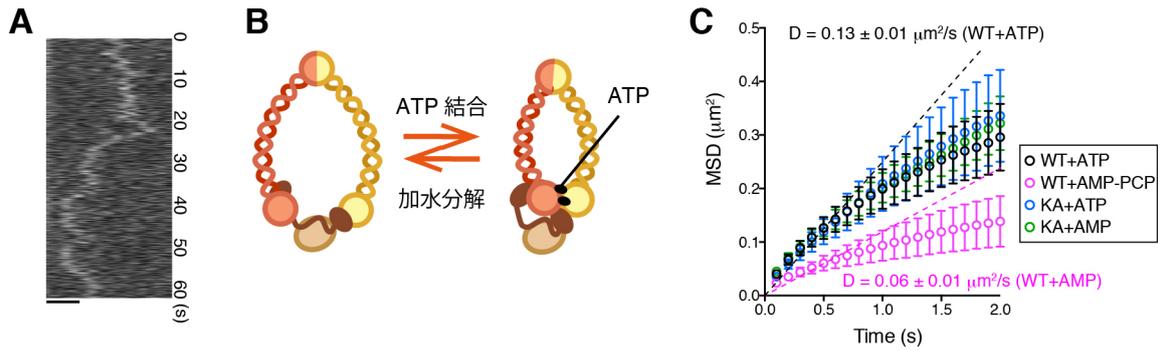


図2. コヒーシンの自由拡散運動と ATP 加水分解の影響

(A) DNA 上を自由拡散運動するコヒーシンのカイモグラフ。スケールバー： $2\mu\text{m}$ 。(B) コヒーシン複合体の ATP 加水分解サイクル。Smc1 と Smc3 のヘッドドメインに ATP 結合部位が存在し、ATP が結合するとヘッドドメイン同士が会合し、加水分解を行う。加水分解されるとヘッドドメインは解離する。AMP-PCP は加水分解されないアナログであるため、ヘッドドメインが会合したままの状態が維持される。(C) AMP-PCP はコヒーシンの動きを抑制する。平均二乗変位 (MSD) を時間に対してプロットした。傾きは D (拡散係数) を示す。野生型 (WT) コヒーシンにおいて、AMP-PCP は ATP に比べて拡散係数を下げる作用を持っていた。一方、コヒーシンの ATP 非結合型 KA 変異体においては、AMP-PCP による抑制作用が見られなかった。

2. Smc3 のアセチル化はコヒーシンの運動を促進し、Wapl-Pds5 は抑制する作用をもつ

つぎに、コヒーシンの動きに対するコヒーシン修飾因子および結合因子の作用を検討した (図3)。コヒーシン Smc3 サブユニットのヘッドドメインには、真核生物の間で広く保存されたリシン残基が存在し、このリシン残基のアセチル化は、接着の確立に必須であることが知られている¹⁾。そこで、この保存されたアセチル化がコヒーシンの動きにどのような影響を及ぼすのかを解析したところ、アセチル化酵素 Escol1 によってアセチル化させたコヒーシン複合体は、非アセチル化コヒーシンにくらべて拡散係数が増加することが明らかになった。一方、コヒーシンを染色体から解離させるのに必要なコヒーシン結合因子 Wapl-Pds5 は、拡散係数を減少させた。興味深いことに、Wapl-Pds5 によって抑制されたコヒーシンの動きは、アセチル化によって回復した。このことは、コヒーシンのアセチル化が Wapl-Pds5 の作用に拮抗することでコヒーシンの運動を促進する可能性を示唆している。アセチル化がどのようにしてコヒーシンの拡散係数を上昇させるのか、その詳細なメカニズムは不明であるが、AMP-PCP や Wapl によってコヒーシンの動きが抑制されることを考慮すると、アセチル化がコヒーシンリングの内径を物理的に広げる、あるいは DNA との相互作用を減弱させることで、動きを加速している可能性が考えられる。

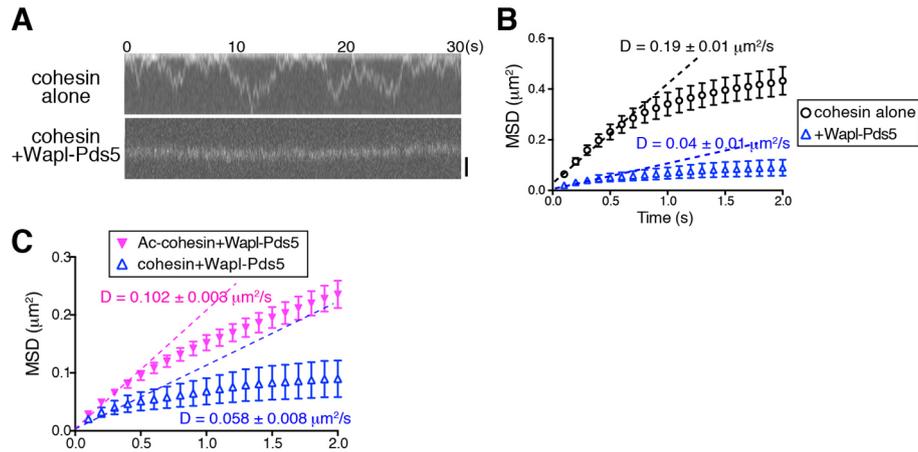


図 3. アセチル化と Wapl-Pds5 がコヒーシンの運動に及ぼす影響

(A) Wapl-Pds5 複合体存在下、あるいは非存在下におけるコヒーシンの動きを示すカイモグラフ。スケールバー：1 μm 。(B) (A) における MSD プロット。Wapl-Pds5 複合体はコヒーシンの拡散係数を顕著に減少させた。(C) アセチル化コヒーシンは Wapl-Pds5 による運動抑制作用に対して拮抗する動きをもつ。Wapl-Pds5 存在下で抑制されたコヒーシンの運動は、コヒーシンのアセチル化によって回復した。

3. Smc3 のアセチル化はクロマチン上におけるコヒーシンの運動に必要である

緩衝液中において観察されたクロマチン化されていない naked DNA 上でのコヒーシンの運動は、細胞核内クロマチン上でも実際に観察されるのだろうか。この点を明らかにするため、アフリカツメガエル卵抽出液を用い、DNA をクロマチン化させたときのコヒーシンの動きを観察した (図 4A)。

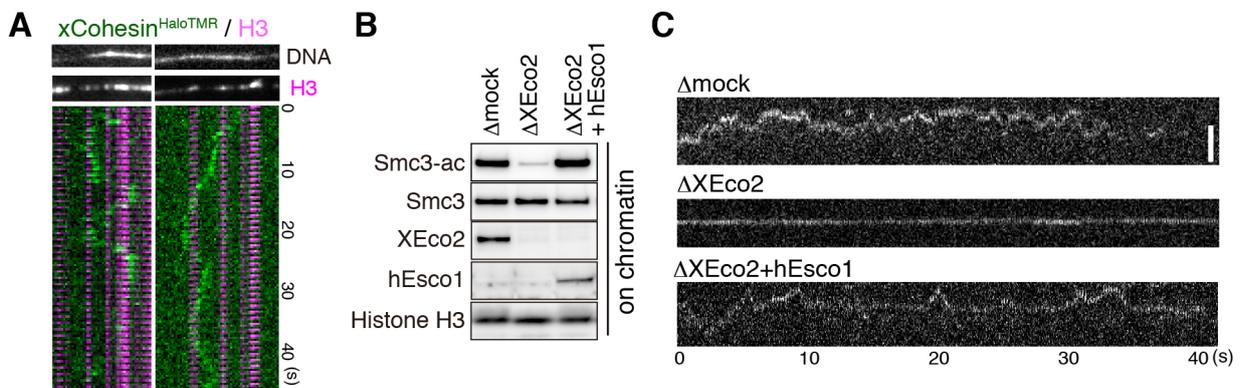


図 4. クロマチン上におけるコヒーシンの運動

(A) 蛍光標識したツメガエルコヒーシンのクロマチン上での動きを観察したカイモグラフ。ヒストンの存在量が多い領域で、コヒーシンの動きが停滞している様子が観察された。スケールバー：5 μm 。(B) ツメガエル卵抽出液における XEco2 の免疫除去とその回復をウェスタン解析により確認した。XEco2 を免疫除去した卵抽出液中 (ΔXEco2) においてはコヒーシン Smc3 のアセチル化 (Smc3-ac) が顕著に減少した。一方、この卵抽出液に human Escol を添加したところ ($\Delta\text{XEco2+hEco1}$)、Smc3 のアセチル化が回復した。(C) (B) のそれぞれの卵抽出液中におけるコヒーシンの動きを示したカイモグラフ。XEco2 を免疫除去した卵抽出液中ではコヒーシンの動きが抑制され、hEco1 によってアセチル化を回復させると動きが回復した。スケールバー：2 μm 。

卵抽出液中でクロマチン化された DNA は、ヒストンを取り込み、ヌクレオソームを形成した。ここに、精製して蛍光標識したツメガエルコヒーシン複合体を添加したところ、内在性コヒーシンと同様、複製前複合体 (pre-RC) 依存的に蛍光標識コヒーシンが DNA 上に結合し、緩衝液中で観察したのと同様、DNA 上を移動していく様子が観察された。コヒーシンの運動とヌクレオソーム形成位置を比較したところ、興味深いことに、ヌクレオソーム密度の高い場所でコヒーシンが停滞していることがわかった。このことは、35 nm 程度と考えられていたコヒーシンの内径が、実際はさらに小さく、直径 10 nm 程度と考えられるヌクレオソームですら運動の障害になり得ることを示唆している。

次にアセチル化の影響を検討するため、ツメガエル卵抽出液中でコヒーシンのアセチル化に必要であるアセチルトランスフェラーゼ XEco2 を卵抽出液から免疫除去し、コヒーシンのクロマチン上での動きを観察した (図 4B、C)。その結果、コヒーシンの動きは XEco2 の除去により顕著に抑制され、ヒトのオーソログである Escol を add-back した卵抽出液中ではアセチル化が回復すると同時にコヒーシンの運動も回復した。このことは、細胞内においてもアセチル化がコヒーシンのクロマチン上での運動に必要な可能性を強く示唆している。

4. DNA 複製中におけるコヒーシンの動態解析

卵抽出液中のコヒーシンの動きの意義を明らかにするため、次に、DNA 複製中におけるコヒーシンの動きを観察した。ツメガエル卵抽出液では、大量の精子核 DNA で核を形成させ、これを回収することで、核質成分を濃縮させた核質抽出液 (Nucleoplasmic extract: NPE) を得ることができる。この NPE を一分子観察系に導入することで、カバーガラス上の DNA を複製させることができる。さらに DNA 複製フォークに局在する因子 Fen1 を蛍光標識することで、DNA 複製の進行をリアルタイムで可視化することができ、我々は、この系を用いて、DNA 複製中のコヒーシンの動きを観察することに成功した。その結果、コヒーシンの動きは、1) DNA 複製の進行に伴って移動していくもの、2) コヒーシンが動かないために DNA 複製が止まってしまうもの、3) 複製された DNA に取り込まれたもの、4) DNA 複製との衝突により DNA から外されたもの、に分類できることが分かった。

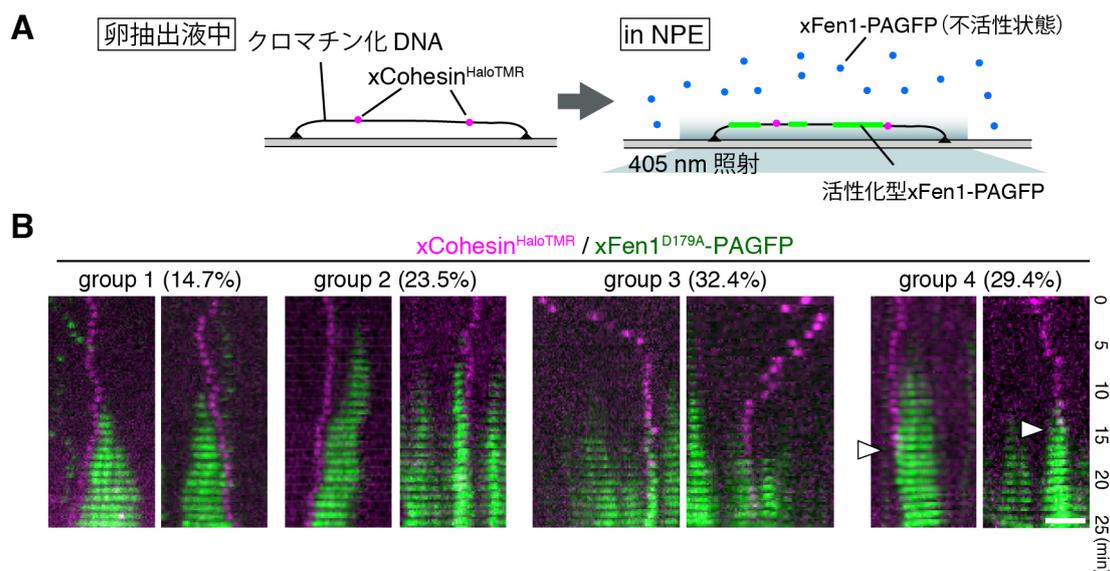


図5. DNA複製中におけるコヒーシンの挙動

(A) DNA複製とコヒーシンモニター系の確立。卵抽出液中でDNAをクロマチン化させ、コヒーシンをロードさせた後、NPEを流すことでDNAを複製させた。DNAの複製は、複製因子Fen1にPAGFP(photoactivatable GFP)を付加した融合タンパク質によりモニターした。PAGFPは405 nmの光で励起することによりはじめてGFPの蛍光を発するため、カバーガラス付近のみを励起することで、DNA上のFen1のみGFPの蛍光を発し、DNA複製バブルを観察することができる。(B) (A)の系で観察したDNA複製中のコヒーシンの挙動を示すカイモグラフ。グループ1: DNA複製の進行に伴って移動していくもの、グループ2: コヒーシンが動かないためにDNA複製が止まってしまうもの、グループ3: 複製されたDNAに取り込まれたもの、グループ4: DNA複製との衝突によりDNAから外されたもの(白矢尻の時点でコヒーシンが外れている)。スケールバー: $2\mu\text{m}$ 。

この結果は、コヒーシンがクロマチン上で移動できる状態にあることが、DNAとトポロジカルに結合した状態のコヒーシンとDNA複製との衝突回避に極めて重要である可能性を示唆している。一方で接着という重要な機能を発揮するためには、DNA複製後にコヒーシンが接着を維持している必要があり、3)で見られたようにDNA複製の進行を許可する特別な仕組みが必要である。この分子メカニズムは今のところ不明であり、今後の更なる解析が必要である。

DNA複製と同様、転写のマシナリーとコヒーシンとの衝突回避も染色体にとっては重要なしくみであり、実際、我々の研究成果³⁾とほぼ同時(あるいはその後)に、出芽酵母やマウスのゲノム上でコヒーシンが転写活性依存的に遺伝子の3'側に移動していく様子が観察されており⁴⁻⁶⁾、コヒーシンがゲノム上で移動することの重要性が明らかにされつつある。コヒーシンがゲノム上で自由に移動できることが、遺伝子発現やDNA複製との競合を回避していることを考えると、コヒーシン複合体あるいはその結合因子や修飾因子の変異を原因とするコヒーシン病において、コヒーシンの可動性に異常を来している可能性もあり、この可能性を検討することが今後の重要な課題である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院理学研究科の菅家舞、Research Institute of Molecular PathologyのPim J Huis in't Veldである。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Peters JM, Nishiyama T. Sister chromatid cohesion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(11). doi: 10.1101/cshperspect.a011130. PubMed PMID: 23043155.
- 2) Mannini L, Menga S, Musio A. The expanding universe of cohesin functions: a new genome stability caretaker involved in human disease and cancer. *Hum Mutat.* 2010;31(6):623-30. doi: 10.1002/humu.21252. PubMed PMID: 20513141.
- 3) Kanke M, Tahara E, Huis In't Veld PJ, Nishiyama T. Cohesin acetylation and Wapl-Pds5 oppositely regulate translocation of cohesin along DNA. *EMBO J.* 2016;35(24):2686-98. doi: 10.15252/embj.201695756. PubMed PMID: 27872142.
- 4) Ocampo-Hafalla M, Munoz S, Samora CP, Uhlmann F. Evidence for cohesin sliding along budding yeast chromosomes. *Open Biol.* 2016;6(6). doi: 10.1098/rsob.150178. PubMed PMID: 27278645.
- 5) Davidson IF, Goetz D, Zaczek MP, Molodtsov MI, Huis In 't Veld PJ, Weissmann F, et al. Rapid movement and transcriptional re-localization of human cohesin on DNA. *EMBO J.* 2016;35(24):2671-85. doi: 10.15252/embj.201695402. PubMed PMID: 27799150.
- 6) Busslinger GA, Stocsits RR, van der Lelij P, Axelsson E, Tedeschi A, Galjart N, et al. Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl. *Nature.* 2017;544(7651):503-7. doi: 10.1038/nature22063. PubMed PMID: 28424523.