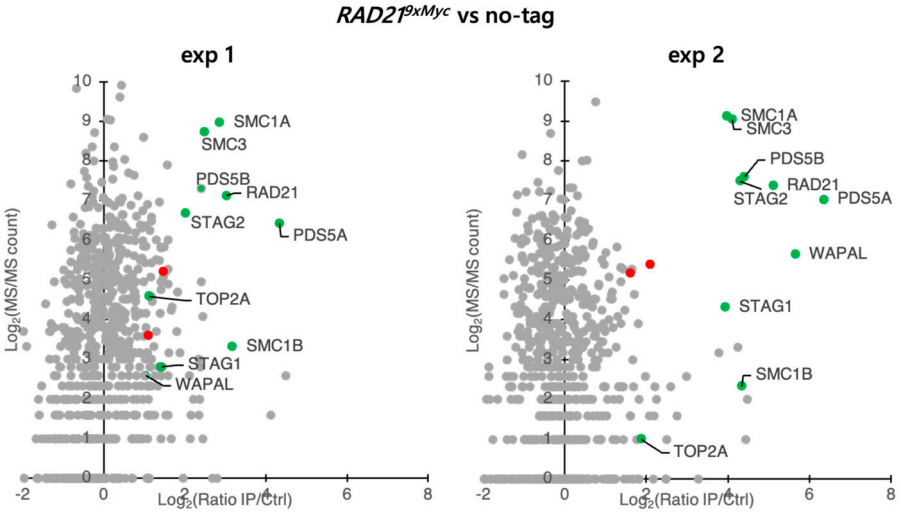
111　ゲノムをかたち作るアセチル化ターゲットの探索	川澄　遼太郎

【目的】ゲノム DNA は「生命の設計図」であり、不正確な情報が次世代へと引き継がれることで細胞死やガン化の原因となる。次世代へ染色体を正確に分配する上で「コヒーシン」と呼ばれるリング状のタンパク質複合体が中心的な役割を果たすことが知られている。コヒーシンは DNA をリング内に束ねる機能（姉妹染色分体間接着、SCC）と、DNA を折りたたむ機能（ループ形成）を持つことが知られている。コヒーシンは挿入因子の働きによって DNA をリング内に包括する一方で、解離因子である WAPL によって DNA から外されるため、コヒーシン-DNA 結合は不安定である。一方で正確な染色体分配の達成にはコヒーシン-DNA 結合の安定化が必要であり、アセチル化酵素 ESCO1/2 がその役目を果たしている。ESCO1/2 はコヒーシンサブユニットの一つである SMC3 をアセチル化することで解離因子 WAPL に対してコヒーシンを抵抗性にすると考えられており、このモデルは酵母から高等真核生物でも広く保存されたメカニズムであると考えられてきた。しかしながら最近の研究により、酵母とでは ESCO1/2 によるコヒーシンの制御が SMC3 のアセチル化に依存しない可能性が示唆された。本研究では、遺伝学とプロテオミクスの融合により ESCO1/2 のアセチル化の新規基質を探索し、ESCO1/2 によるアセチル化を基盤としたゲノム構造制御メカニズムの理解を目指す。

【方法】*ESCO1/2* を遺伝子編集したニワトリ DT40 細胞と、質量分析計によるプロテオーム解析を組み合わせ ESCO1/2 の新規基質の同定を試みた。野生型細胞と *ESCO2* 遺伝子変異細胞のリジンを ^{14}N と ^{15}N で安定同位体標識し、抗アセチル化リジン抗体により免疫沈降を実施し、アセチル化されたタンパク質の網羅的比較を行なった。また、ESCO1/2 のターゲットをコヒーシンに絞って基質を探索するため、コヒーシンのサブユニットである RAD21 に 9xMyc タグを導入した細胞を用いて免疫沈降を行い、相互作用因子の同定を試みた。

【結果】安定同位体標識を用いた SILAC（Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture）法では、6 種類のタンパク質で ESCO2 変異依存的なアセチル化の低下が確認されたものの、染色体構造制御への関与が期待できる因子は同定されなかった。また、コヒーシンの新規相互作用因子の探索の結果、コヒーシンサブユニットとともにこれまでにコヒーシンとの相互作用の報告がないクロマチンリモデラーX が同定された。今後クロマチンリモデラーX のコヒーシン制御における役割の調査を進めていく。

コヒーシンの新規相互作用因子としてクロマチンリモデラーX を同定した



111. ゲノムをかたち作るアセチル化ターゲットの探索

川澄　遼太郎

東京都立大学 理学研究科 化学専攻 生物化学研究室

Key words：コヒーシン，アセチル化，クロマチン構造，染色体分配，ESCO1/2

緒　言

ゲノムは「生命の設計図」であり、不正確な情報が次世代へと引き継がれることで細胞死やガン化の原因となる。ゲノムの本体である DNA はポリメラーゼによって複製され、染色体と呼ばれる DNA-タンパク質複合体を形成し、娘細胞へと均等に分配される。このように、遺伝情報を正確に継代するために多様な反応が協調して進むが、長さ 2 メートルに達するゲノム DNA は直径 100 ミクロメートル未満の細胞内に高度に折り畳まれた状態で格納されているため、DNA の複製・転写・修復や染色体の分配等、必要に応じてその構造をダイナミックに変える。

そこで中心的な役割を果たすのが「コヒーシン」と呼ばれるリング状のタンパク質複合体である［1］。コヒーシンは DNA をリング内に束ねる機能（姉妹染色分体間接着、SCC）と、DNA を折りたたむ機能（ループ形成）を持つことが知られている。SCC は均等な染色体の分配に必須であるため、生物種に依存せず広く保存された機能であると考えられており、主に酵母を用いた研究によりメカニズムの理解が進んでいる。一方でループ形成の機能は次世代シーケンサーを使った Hi-C 技術の開発などにより最近研究が進んだ部分であり、SCC と比較して未解明な部分が多いが、細胞の分化や転写の制御において重要な役割を果たすことが分かってきている［1］。

コヒーシンは複数のサブユニットからなる複合体であり、挿入因子の働きによって DNA をリング内に包括する。一方で解離因子である WAPL によって DNA から外されるため、コヒーシン-DNA 結合は不安定である。よって正確な染色体分配の達成にはコヒーシン-DNA 結合の安定化が必要となるが、そこで重要な働きをするのがアセチル化酵素である ESCO1 と ESCO2 である。ESCO1/2 はコヒーシンサブユニットの一つである SMC3 をアセチル化することで解離因子 WAPL に対してコヒーシンを抵抗性にすると考えられている［2，3］。この「SMC3 アセチル化モデル」は主に酵母を用いた研究に基づいて考案されたものであり、高等真核生物でも広く保存されたメカニズムであると考えられてきた。しかしながら最近の研究により、動物細胞では ESCO1/2 によるコヒーシンの制御が SMC3 のアセチル化に依存しない可能性が示唆された［4］。ESCO1 は急性骨髄性白血病などで異常な活性化が認められ、また、ESCO2 の変異は遺伝性疾患であるロバーツ症候群の原因として知られ、発ガンリスクの上昇につながる可能性が報告されていることから［5，6］、ESCO1/2 によるゲノム構造制御メカニズムの理解は医学的、生物学的に重要な研究課題である。

本研究では、ESCO1/2 によるゲノム構造制御メカニズムの理解を目指し、免疫沈降法と質量分析計を用いたプロテオミクスにより ESCO1/2 のアセチル化の新規基質を探索した。その結果、アセチル化基質の同定は実現しなかったものの、コヒーシンの新規相互作用因子としてクロマチンリモデラーX を同定した。

方　法

1. SILAC 法と遺伝学の融合による ESCO2 アセチル化ターゲットの探索

ESCO2 遺伝子欠損細胞は細胞の増殖に顕著な遅れが見られるため、ロバーツ症候群の原因となる変異 *ESCO2-W615G* の変異を導入した DT40 細胞を作製し SILAC（Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture）に使用した。*ESCO2-W615G* 細胞は既知の ESCO2 の既知のターゲットである SMC3 のアセチル化の低下は認められるものの、細胞の増殖に遅れは見られない［4］。DT40 野生型細胞と *ESCO2-W615G* 細胞をそれぞれ ^{14}N-リジン、

^{15}N-リジン存在下で 3 日間培養（細胞分裂 9 回相当）することでタンパク質の同位体標識を実施した。その後、 フローサイトメトリーにより細胞数を計測し、野生型細胞と *ESCO2-W615G* 細胞を 1 : 1 で混合し CSK buffer により溶解し可溶画分を除いた後、ソニケーションによりクロマチンの可溶化を行った。クロマチン画分をインプットとして、磁気ビーズにカップリングした抗アセチル化リジン抗体を用いて免疫沈降を実施した。免疫沈降後のサンプルは SDS-PAGE で泳動後 In-Gel トリプシン消化処理し、LC-MS/MS による解析を行った。

2. コヒーシンの免疫沈降による新規コヒーシン制御因子の探索

方法 1 のバックアップとしてコヒーシンを免疫沈降するアプローチも試みた。コヒーシンのサブユニットの一つである RAD21 の C 末端にフリップインシステムを使って 9xMyc タグを導入した（*RAD21^{9xMyc}* 細胞）[7]。*RAD21^{9xMyc}* 細胞を CSK buffer により溶解し可溶画分を除いた後、ソニケーションによりクロマチンの可溶化を行った。クロマチン画分をインプットとして、磁気ビーズにカップリングした抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を実施した。免疫沈降後のサンプルは SDS-PAGE で泳動後 In-Gel トリプシン消化処理し、LC-MS/MS による解析を行った。

結果および考察

1. 抗アセチル化リジン抗体を使った SILAC では有望な新規基質は検出されなかった

ESCO2 の新規アセチル化ターゲットを探索するため、方法 1 の通り SILAC 法を実施した（図 1a）。ESCO2 の基質のアセチル化レベルは野生型と比較して *ESCO2-W615G* 細胞では低下していることが予想される。したがって *ESCO2-W615G* 細胞の野生型細胞に対する基質のアセチル化レベルの比は 1 より大きくなるはずである。SILAC の解析の結果、抗アセチルリジン抗体により精製されたサンプルからは 153 のタンパク質が同定された（図 1b）。*ESCO2-W615G* 細胞で低下が見られるタンパク質の可視化のため、^{14}N-リジン、^{15}N-リジンによる標識を入れ替えて実施した独立した実験結果をそれぞれ横軸と縦軸にプロットした。独立した二回の実験で、アセチル化レベルが 1.5 倍以上低下していたものを有意にアセチル化が低下していたものとして検出したところ、RPL22、RPL21、RPS25（リボソームタンパク質）、SDOS、YBX1、GAPDH の 6 種類のタンパク質が同定された。しかしながら、同定されたタンパク質はいずれもクロマチン構造の制御に関わるという報告がなく、既知の基質である SMC3 が検出されなかったことからも手法の改善が必要と考えられる。また、今回のプロテオーム解析ではアセチル化リジンを含むペプチドを直接検出できなかった。これらの結果から、今後はトリプシン消化後のペプチドを抗アセチル化リジン抗体により濃縮する、ペプチド IP 法の導入を検討する。

2. コヒーシンの IP-MS により新規相互作用因子を同定した

今回のターゲットである ESCO1/2 の新規基質はクロマチン構造の制御に関わっているはずである。したがって、既知の SMC3 のアセチル化サイト以外のコヒーシン関連因子の何かである可能性が高い。そこで標的をコヒーシンに絞って免疫沈降することで基質の同定を試みた。方法 2 に記す通り、コヒーシンサブユニットである RAD21 に 9xMyc タグを導入し、抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、LC-MS/MS によるプロテオーム解析を実施した。その結果、コヒーシンサブユニットである SMC1A、SMC3 などが有意に RAD21 と共沈していることがわかった（図 2）。興味深いことに、既知のコヒーシン制御因子である WAPL などに加え、新規コヒーシン相互作用因子であるクロマチンリモデラーX を独立した実験において検出した（図 2）。RSC 複合体をはじめとしたクロマチンリモデラーはコヒーシンのローディングを促進する働きが報告されているため、本研究で同定したクロマチンリモデラーX も類似したメカニズムでコヒーシンの制御に寄与している可能性が考えられる。今後はクロマチンリモデラーX とコヒーシンの相互作用を基盤にしたクロマチン構造制御機構の調査に取り組んでいく。

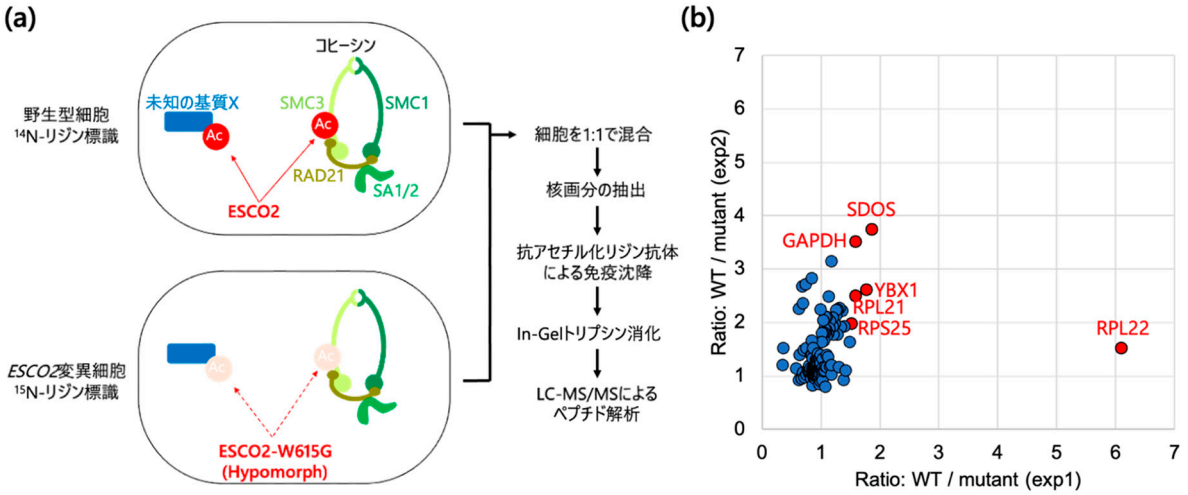


図 1. *ESCO2* 変異細胞と SILAC 法によるアセチル化基質の探索

a) 実験のフローの概略。野生型 DT40 細胞と *ESCO2* 変異型細胞をそれぞれ ^{14}N-リジン、^{15}N-リジンで標識し、抗アセチル化リジン抗体を用いてアセチル化されたタンパク質を濃縮し、質量分析計により解析した。

b) SILAC により得られた野生型細胞と *ESCO2* 変異型細胞のタンパク質アセチル化レベルの比を示した。横軸は 1 回目、縦軸には 2 回目の結果を示した。2 回の独立な実験でいずれも比が 1.5 以上だったものを赤で示した。

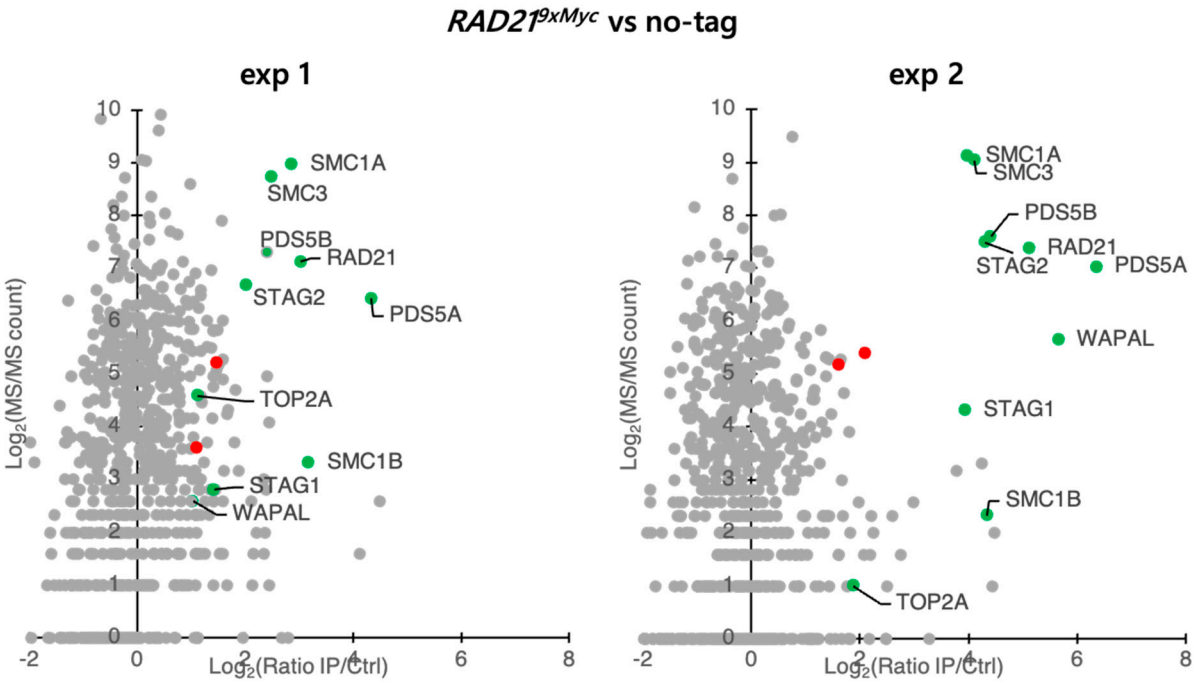


図 2. RAD21^{9xMyc} をベートとしたコヒーシン相互作用因子の探索

RAD21^{9xMyc} 細胞とタグなしの細胞に対して CSK buffer によりクロマチン画分の抽出を実施した後、抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を行い LC-MS/MS により解析した。既知のコヒーシンサブユニットや制御因子を緑で示した。2 回の独立した実験においてクロマチンリモデラーX のサブユニット（赤）がコヒーシンと共沈していることが確認された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、IFOM ETS - The AIRC Institute of Molecular Oncology の Dana Branzei 教授、Angela Bachi 教授、Vittoria Matafora 博士、東京都立大学大学院理学研究科生物化学研究室の廣田耕志教授、東北医科薬科大学薬学部生化学研究室の阿部拓也講師です。本研究への多大なご協力に感謝申し上げます。

文　献

1） Hoencamp C, Rowland BD. Genome control by SMC complexes. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. 2023 May 25; Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41580-023-00609-8 PMCID: 452628

2） Unal E, Heidinger-Pauli JM, Kim W, Guacci V, Onn I, Gygi SP, Koshland DE. A molecular determinant for the establishment of sister chromatid cohesion. Science. 2008 Jul 25;321(5888):566-569. PMID: 18653894

3） Rolef Ben-Shahar T, Heeger S, Lehane C, East P, Flynn H, Skehel M, Uhlmann F. Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. Science. 2008 Jul 25;321(5888):563-566. PMID: 18653893

4） Kawasumi R, Abe T, Arakawa H, Garre M, Hirota K, Branzei D. ESCO1/2’s roles in chromosome structure and interphase chromatin organization. Genes Dev. 2017 Nov 1;31(21):2136-2150. PMCID: PMC5749162

5） Vega H, Waisfisz Q, Gordillo M, Sakai N, Yanagihara I, Yamada M, van Gosliga D, Kayserili H, Xu C, Ozono K, Jabs EW, Inui K, Joenje H. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. Nat Genet. 2005 May;37(5):468–470. PMID: 15821733

6） De Koninck M, Losada A. Cohesin Mutations in Cancer. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2016 Dec 1;6(12). Available from: http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a026476 PMCID: PMC5131750

7） Kobayashi K, Fujii T, Asada R, Ooka M, Hirota K. Development of a targeted flip-in system in avian DT40 cells. PLoS One. 2015 Mar 23;10(3):e0122006. PMCID: PMC4370768