

コヒーシ分子機能におけるサブユニット
依存的な **DNA** 結合安定性と構造ダイナミクスの
制御機構の解析

坂田 凌大

目次

略語表	1
要旨	2
第1章 序論	3
1.1 コヒーシンの構造と機能	3
1.1.1 コヒーシンの構造	
1.1.2 S～M 期におけるコヒーシンの機能	
1.1.3 G1 期におけるコヒーシンの機能	
1.1.4 トポロジカル結合と DNA ループ形成の分子メカニズムと相違点	
1.2 STAG タンパク質の機能と重要性	8
1.2.1 コヒーシン分子機能における STAG タンパク質の重要性	
1.2.2 コヒーシン分子機能における STAG1/2 の差違	
1.2.3 疾患における STAG1/2 の差違	
1.2.4 STAG タンパク質の進化的保存性	
1.2 本研究の目的と結果の概要	12
第2章 材料と方法	24
第3章 コヒーシン分子機能におけるヘッドドメイン構造変化の重要性	
3.1 緒言	33
3.2 結果	34
3.2.1 コヒーシンの過剰な安定化は DNA ループ形成を阻害する	
3.2.2 ヘッドドメインの強制的な会合によりクロマチン上のコヒーシンは過剰に安定化される	
3.2.3 ヘッドドメインの強制的な会合は適切な染色体分配を阻害する	

3.3 考察	37
3.3.1 DNA ループ形成活性におけるヘッドドメイン解離の必要性	
3.3.2 細胞内におけるヘッドドメイン解離の必要性	

第4章 AT-hook による DNA 結合安定性の制御とゲノム高次構造形成解析

4.1 緒言	45
4.2 結果	46
4.2.1 STAG1 は STAG2 よりも高い DNA ループ形成活性を持つ	
4.2.2 AT-hook はコヒーシンによる効率的な DNA ループ形成に必要な る	
4.2.3 AT-hook はコヒーシンの安定的な DNA 結合に必要である	
4.2.4 AT-hook は G1 期における安定的なクロマチン結合に必要である	
4.2.5 姉妹染色分体間接着は AT-hook に依存しない	
4.2.6 AT-hook はクロマチン高次構造形成を促進する	
4.2.7 AT-hook は Smc3 のアセチル化と CTCF との相互作用を促進する	
4.2.8 STAG1N 末端領域の KR パッチが DNA ループ形成を促進する	
4.3 考察	56
4.3.1 AT-hook による DNA 結合安定性の制御と DNA ループ形成メカニ ズム	
4.3.2 AT-hook によるコヒーシンの安定化とゲノム高次構造形成の促進 (i) CTCF によるコヒーシン安定化メカニズム (ii) Smc3 アセチル化によるコヒーシン安定化メカニズム (iii) G2 期における AT-hook の寄与	
4.3.2 ゲノム高次構造形成メカニズムの進化的保存性	

第5章 Scc1 フレキシブル領域による複合体構造変化の制御

5.1 緒言	94
--------------	----

5.2 結果	95
5.2.1 Scc1 フレキシブル領域はコヒーシンリング径の拡大に重要である	
5.2.2 Scc1 のフレキシブル領域はコイルドコイルの屈曲を促進する	
5.3 考察	97
5.3.1 Scc1 フレキシブル領域によるコヒーシン構造変化への寄与	
5.3.2 Scc1 フレキシブル領域依存的な DNA ループ形成メカニズム	
第6章 総括	104
(i) トポロジカル結合と DNA ループ形成の分子メカニズム的差違	
(ii) 細胞内における接着と DNA ループ形成の棲み分け	
参考文献	109
謝辞	126

略語表

SMC	Structural Maintenance of Chromosomes
STAG	Stromal Antigen
Scc1	Sister chromatid cohesion 1
ATP	Adenosine triphosphate
IDR	Intrinsically disordered region
HAWKs	HEAT repeat proteins associated with kleisins
HEAT	Huntington-Elongation factor 3-protein phosphatase 2A-TOR1 repeats
KITE	Kleisin interacting tandem winged-helix (WH) elements of SMC complexes
TAD	Topologically associating domain
CTCF	CCCTC-binding factor
FKBP	FK506-binding protein
FRB	FKBP-rapamycin-binding domain
Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1
FRET	Förster resonance energy transfer
HS-AFM	High-speed atomic force microscopy

要旨

ゲノム DNA の正確な複製を起点とする遺伝情報の継承と、生体機能の基盤的プロセスである遺伝子の発現制御は、生物に普遍的に保存された必須機能である。真核生物において、これらの細胞内プロセスにグローバルに寄与するタンパク質複合体として、コヒーシンが知られている。コヒーシンは、姉妹染色分体間接着に必須な因子として、細胞分裂におけるゲノムの正確な継承を担保する一方で、遺伝子発現制御に関わるその新規機能としてゲノム高次構造形成が注目されつつある。特に、コヒーシンによる DNA ループ押出し活性は、遠位に存在するプロモーターやエンハンサーといった遺伝子発現の制御エレメント同士を三次元的に近接させる DNA ループ構造形成の原動力になり得ると考えられている。これらコヒーシンの分子機能の制御には、コヒーシンを構成する 4 つのサブユニットが全て必須であることが示されているが、詳しい分子メカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、コヒーシン-DNA 間相互作用に関わるサブユニットとして、Smc1/3 ヘッドドメインと DNA 結合能を持つ STAG、そして、複合体の構造安定性に関わるサブユニットとして Scc1 に着目した解析を行った。第 3 章では、コヒーシンによる DNA ループ押出し活性を定量的に解析する一分子観察系を確立し、ヘッドドメインの強制的な会合によるコヒーシンの過剰な安定化が、DNA ループ形成を阻害することを明らかにした。また、細胞内においても、コヒーシンの過剰な安定化が分裂期から G1 期への移行に欠陥をもたらすことを明らかにした。第 4 章では、脊椎動物がもつ 2 種類の STAG パラログである STAG1、STAG2 に着目し、一分子レベルの解析から、STAG1-コヒーシンが STAG-2 コヒーシンより安定的に DNA と相互作用し、より高い頻度で DNA ループを形成することを明らかにした。さらに、これらが STAG1 に特有の DNA 結合配列である AT-hook モチーフに依存しており、細胞内においては、AT-hook は姉妹染色分体間接着に必須でない一方で、クロマチン結合安定性とゲノム高次構造の形成に重要であることが示された。第 5 章では、Scc1 の持つ IDR 領域の長さが、複合体全体のダイナミックな構造変化に重要であることを明らかにした。本研究の結果から、コヒーシン-DNA 間相互作用の安定性と複合体それ自体の構造変化がコヒーシン分子活性に重要であり、コヒーシンのもつ ATP 加水分解活性とサブユニットの性質の両面からそれらが適切に制御されることで、生体内におけるコヒーシンの機能に寄与していることが明らかになった。

第1章 序論

1.1 コヒーシンの構造と機能

1.1.1 コヒーシンの構造

コヒーシンは SMC (Structural Maintenance of Chromosome) とよばれるタンパク質複合体ファミリーの一種であり、SMC タンパク質 Smc1、Smc3 および non-SMC サブユニット Scc1、STAG の4つのサブユニットにより構成されるリング状のタンパク質複合体である (Fig.1-1) (Gruber *et al.*, 2003; Haering *et al.*, 2002)。Smc1 および Smc3 は、末端領域から成る球状のヒンジドメインとヘッドドメインが 50 nm 長の逆平行コイルドコイルによってつながれた構造を持ち、両者はヒンジドメインを介して二量体化する。コイルドコイルは複合体内でも比較的ダイナミックな構造をもち、中央の elbow と呼ばれる領域を起点として屈曲することが原子間力顕微鏡を用いた観察により示されている (Fig.1-1) (Bauer *et al.*, 2021; Bürmann & Löwe, 2023)。ヘッドドメインは ABC 型 ATP 結合カセットを介した ATPase 活性をもち、ATP の結合・加水分解により両者のヘッドドメインが会合・解離することが知られている (Fig.1-1 (i)) (Haering *et al.*, 2004)。

Scc1 は Kleisin と呼ばれる SMC タンパク質複合体に共通したサブユニットのひとつであり、N 末端、C 末端の球状ドメインがそれぞれ Smc3、Smc1 と相互作用し、100 nm 超の長大な天然変性領域 (IDR) を介して両者をつなぐことでリング状構造を形成する (Fig.1-1 (ii)) (Gligoris *et al.*, 2014; Haering *et al.*, 2004)。さらに、HAWKs と呼ばれるサブユニットである STAG タンパク質が Scc1 の IDR に結合することでコヒーシン四量体を形成する (Hara *et al.*, 2014)。

STAG タンパク質は、構造化領域の大半が 2 つの α ヘリックスの繰り返しから成る HEAT リピートにより構成されており、両末端領域に IDR をもつ。脊椎動物のコヒーシンにおいては、STAG1、STAG2、STAG3 の3種類のパラログが存在し、体細胞においては STAG1 もしくは STAG2 を、生殖細胞においては減数分裂特異的に STAG3 を発現している (Losada *et al.*, 2000; Pezzi *et al.*, 2000; Sumara *et al.*, 2000)。これらは相互排他的に Scc1 と結合することで異なるタイプのコヒーシン複合体を形成している (Fig.1-1 (iii))。

HAWKs サブユニットは STAG タンパク質のようにコヒーシンと常時結合しているものだけでなく、コヒーシンの DNA 上へのローディングに必要な NIPBL、クロマチン上での結合安定化や解離に働く Pds5a/b といった他の制御因子も知られており、一過的にコヒーシン四量体と結合することでその機能の調節に働く (Fig.1-1 (iv)) (Kikuchi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016)。

1.1.2 DNA 合成期(S 期)～有糸分裂期(M 期)におけるコヒーシンの機能

コヒーシンは細胞周期を通して存在しており、DNA を基質とする多様な細胞内プロセスに寄与することが知られている。中でも S 期から M 期におけるコヒーシンのカノニカルな機能が、姉妹染色分体間接着である。姉妹染色分体間接着は、S 期の DNA 複製に伴って確立され、複製された 2 本の染色分体を M 期までつなぎ止めることで正確な染色体分配を担保する (Reviewed in Murayama, 2025)。姉妹染色分体間接着の異常は、分裂後の娘細胞における DNA の断片化や異数性を引き起こし、疾患の原因となる (Peters & Nishiyama, 2012)。細胞内において、姉妹染色分体間接着は、予めクロマチン上にローディングされたコヒーシンが S 期の DNA 複製と協調して接着に働く経路と、複製された DNA 上にコヒーシンがローディングされ、接着に働く *de novo* 経路によって確立されると考えられている (Cameron *et al.*, 2024; Srinivasan *et al.*, 2019, 2020)。前者では、分裂終期から G1 期初期にクロマチン上にローディングされた既存のコヒーシンが複製フォークの通過と協働して 2 本の DNA 鎖とトポロジカルに結合することで、複製された DNA 鎖同士をつなぎ止める (Fig.1-2a (i))。後者では複製フォーク通過後の DNA 鎖にコヒーシンが新たにローディングされ、2 本目の DNA 鎖をリング内に捕捉することで接着を確立させる (Fig.1-2a (ii))。確立された姉妹染色分体間接着は M 期前中期のコヒーシンの染色体腕部からの解離、後期でのセパラゼによるセントロメアにおける接着解消に伴う染色体分離まで維持される (Fig.1-2b) (Uhlmann *et al.*, 1999)。

接着の維持に中心的に働くのが、Smc3 のアセチル化と、コヒーシン安定化因子 Sororin の結合である。脊椎動物では、Smc3 の保存されたリジン残基 (K105/106) がアセチルトランスフェラーゼ Escol1/2 によってアセチル化される (Hou & Zou, 2005; J. Zhang *et al.*, 2008)。Escol1/2 のいずれも Smc3 のアセチル化に働くが、Escol1 が細胞周期を通じて恒常的にコヒーシンをアセチル化し、その安定化に寄与する一方、Escol2 は複製と共役した S 期特異的なアセチル化に働く (Minamino *et al.*, 2015)。Smc3 のアセチル化は、出芽酵母においてはそれ自身が DNA と結合したコヒーシンを安定化させる一方 (Murayama & Uhlmann, 2015)、脊椎動物においては安定化因子 Sororin の結合にも必要である (Rankin *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2007)。Sororin は HEAT リピータンパク質である Pds5 依存的にコヒーシン複合体に結合し、同じく Pds5 と複合体を形成するコヒーシン解離因子 WAPL と拮抗することでコヒーシンのクロマチン結合を維持する (Nishiyama *et al.*, 2010)。M 期に入ると Sororin は Cdk1、Plk1、Aurora B によってリン酸化され、コヒーシンから解離することで WAPL による染色体腕部からのコヒーシンの除去が起こる (Fig.1-2c) (Dreier *et al.*, 2011; Nishiyama *et al.*, 2010; N.

Zhang *et al.*, 2011)。

一方、セントロメア周辺のコヒーシンには Shugoshin (Sgo1) が結合し、WAPL とコヒーシンの相互作用を阻害し、さらに PP2A ホスファターゼをリクルートし Sororin のリン酸化を阻害することで接着を維持する (Gutiérrez-Caballero *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2016)。セントロメア周辺のコヒーシンは微小管により全ての染色体が捕捉されると、Scc1 がセパラゼによって切断されることで解離し、接着が解消される (Fig.1-2d) (Hauf *et al.*, 2001; Uhlmann *et al.*, 1999, 2000; Waizenegger *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2025)。

以上のように、S 期から M 期におけるコヒーシンは種々の安定化因子依存的にゲノムの均等分配を担保する姉妹染色分体間接着因子として働く。

1.2.3 G1 期におけるコヒーシンの機能

コヒーシンは、細胞分裂における姉妹染色分体間接着の必須因子としてだけでなく、間期における転写制御因子としての機能も明らかになりつつある。転写の基盤となるゲノム DNA は、メートルスケールの長さを持つため、階層的な高次構造を形成することでマイクロメートル単位の細胞核内に収容される。近年の研究から、このゲノム DNA の折りたたみが単に DNA 体積の縮小に留まらず、高度にプログラミングされた三次元構造を形成することで、遺伝子発現の制御に寄与していることが明らかになりつつある (Bonev & Cavalli, 2016)。3C (Chromosome Conformation Capture) 法に端を発する次世代シーケンサーを用いたゲノム高次構造解析から、プロモーターやエンハンサーといったゲノム上の転写調節エレメント同士が三次元的に近接/絶縁することで転写の ON/OFF に寄与していること、また、Hi-C 法による全ゲノム領域での高次構造解析から、高次構造の集団が転写活性の高い A コンパートメントと、転写活性の低い B コンパートメントに分類できること、個々の三次元構造のクラスターが数百キロ塩基対 (kbp)~メガ塩基対 (Mbp) 単位の TAD (Topologically Associating Domain) と呼ばれる構造を形成していることが示された (Fig.1-3a,b) (Dixon *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2014; Sexton *et al.*, 2012)。TAD 内では、DNA のループ状構造を基本単位として、前述のように TAD 内部の転写調節エレメント間を近接させるだけでなく、他の TAD 内のゲノム領域との相互作用を遮断することで、遺伝子発現を正負両方向に制御すると考えられている。

コヒーシンはこれらゲノム高次構造の形成に寄与することで、転写制御因子として働き得ると考えられている。ChIP-seq (Chromatin Immuno-Precipitation Sequencing) によるゲノムワイドなコヒーシンの分布解析、およびリガンド依存

的な細胞内コヒーシンの分解技術（デグロン法）とゲノム高次構造解析の組み合わせにより、コヒーシンが TAD 境界に局在していること (Nora *et al.*, 2012)、コヒーシンの急速な分解によって TAD、および DNA ループ構造が消失することが示されたことから (Rao *et al.*, 2017)、これらゲノム三次元構造がコヒーシン依存的に形成されることが明らかになりつつある (Fig.1-3b)。

DNA ループ構造の形成に関して、コヒーシンが姉妹染色分体間接着と同様、トポロジカル結合によって同じ DNA 鎖上の異なる領域を抱え込むことでループの基部を形成するというモデルに加え、コヒーシンがモータータンパク質として DNA ループを直接的に押出すという 2 つのモデルが考えられている (Uhlmann, 2025)。近年のコヒーシン-DNA の一分子レベルでの観察から、コヒーシンが実際に DNA をループ状に押出す、DNA ループ押出し活性を持つことが示されたことから (Davidson *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019)、DNA ループ押出しを基礎としてゲノム高次構造が形成されるという後者の仮説が広く支持されている一方、出芽酵母においては DNA ループ押出し活性を欠くコヒーシンでもゲノム高次構造が見られることや (Guérin *et al.*, 2024)、確率的な DNA の捕捉によるゲノム高次構造形成を支持するシミュレーションも示されており (Cheng *et al.*, 2015; Gerguri *et al.*, 2021)、コヒーシン依存的なゲノム高次構造形成のメカニズムに関しては、統一見解に至っていない (Fig.1-3c)。

1.1.4 トポロジカル結合と DNA ループ押出しの分子メカニズムと相違点

コヒーシンの分子機能として姉妹染色分体間接着に必須であると考えられているのが、コヒーシンがそのリング状構造の内部に DNA 鎖を通す、DNA とのトポロジカルな結合である。この特殊な DNA との相互作用様式は、タンパク質-DNA 間の静電相互作用に依らない高塩濃度耐性であり、他の SMC タンパク質複合体であるコンデンシンや SMC5/6、原核生物の SMC タンパク質複合体でも知られており、コヒーシンにおいても示されている (Minamino *et al.*, 2018; Murayama & Uhlmann, 2014; Niki & Yano, 2016; Shaltiel *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2023; Taschner & Gruber, 2023; Wilhelm *et al.*, 2015)。コヒーシンと DNA とのトポロジカルな結合は既に試験管内再構成系が確立されており、ATP およびコヒーシンローディング因子である NIPBL-Mau2 が必要であること (Murayama & Uhlmann, 2014)、二本鎖 DNA (dsDNA) とトポロジカル結合したコヒーシンが、追加の一本鎖 DNA (ssDNA) をリング内に擁し得ることが示されている (Murayama *et al.*, 2018; Richeldi *et al.*, 2023)。この系を用いたこれまでの研究では、コヒーシンの ATP 加水分解活性変異体および加水分解されない ATP アナログ (ADP/AlFx) を

用いても DNA との相互作用が観察されており、コヒーシンと DNA の初期相互作用には ATP の加水分解よりむしろ ATP の結合によるヘッドドメインの会合が必要であると考えられている (Çamdere *et al.*, 2018; Minamino *et al.*, 2018)。さらに、電子顕微鏡による構造解析から、ATP の結合によるヘッドドメインの会合が、コヒーシンローダーと共働して DNA と安定的に結合する “gripping state” とよばれる遷移状態を誘導することが示されており、この状態に続く ATP 加水分解に依存したヘッドドメインの解離により DNA がコヒーシンリング内に捕捉されると考えられている (Buheitel & Stemmann, 2013; Higashi *et al.*, 2020; Murayama & Uhlmann, 2015)。

一方、トポロジカル結合活性および姉妹染色分体間接着と DNA ループ押出し活性、ゲノム高次構造形成の相違点に関しては不明な点が多い。DNA ループ押出し活性もトポロジカル結合と同様、ATP および NIPBL-Mau2 を必須としている一方で、トポロジカル結合とは異なり、ATP 加水分解活性を欠いたコヒーシンや ATP アナログ存在下では DNA ループ押出し活性を完全に消失する (Davidson *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019)。DNA ループ押出し活性が ATP の加水分解反応に依存する一方で、この反応はリングを完全に架橋し閉じた複合体においても観察されることから、トポロジカル結合そのものは DNA ループ押出しに必要でないことが示されている (Davidson *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019)。この結果と一致して、細胞内において接着能を欠損した変異体でも DNA ループ押出しが可能であることも示されている (Nagasaka *et al.*, 2023)。さらに、DNA ループ押出し活性を欠く変異体においてもトポロジカル結合が可能であることも示されており (Bauer *et al.*, 2021; Guérin *et al.*, 2024)、これらの分子活性が異なるメカニズムにより達成される可能性が高い。

また、これまでの FRET 解析や分子動力的シミュレーションから、コヒーシンを含む種々の SMC タンパク質複合体による DNA ループ押出しのモデルが提案されている (Bauer *et al.*, 2021; Dekker *et al.*, 2023; Higashi *et al.*, 2021; Marko *et al.*, 2019; Nomidis *et al.*, 2022; Shaltiel *et al.*, 2022)。これらの観察・モデルから、DNA ループ押出しにはコイルドコイルの屈曲を起点とする SMC タンパク質複合体全体のダイナミックな構造変化が必要である可能性が強く示唆されている (Fig.1-4b)。その一方で、詳細な分子メカニズムやトポロジカル結合との差を決定づける因子は明らかになっていない。

1.2. STAG タンパク質の機能と重要性

1.2.1. コヒーシン分子機能における STAG タンパク質の重要性

STAG タンパク質は、HAWKs と呼ばれる HEAT リPEAT タンパク質のひとつであり、コヒーシンの DNA 結合に中心的に働く (Y. Li *et al.*, 2018)。STAG タンパク質を欠いた Smc1-Smc3-kleisin から成る三量体コヒーシンでは、トポロジカル結合活性が失われることが出芽酵母で (Murayama & Uhlmann, 2014)、DNA ループ押し出し活性が失われることがヒトで示されており (Davidson *et al.*, 2019)、コヒーシン分子活性に必須のサブユニットであるといえる。近年のコヒーシン-DNA 複合体の構造解析から、STAG タンパク質が内部の複数の DNA 結合パッチを介して DNA と相互作用していることが示され、コヒーシンと DNA の相互作用の足場となっていることが確かめられた (Higashi *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020)。このような HAWKs サブユニットを主体とした複合体と DNA の相互作用は真核生物の SMC タンパク質複合体に共通した性質であり、コンデンシン、SMC5/6 でも STAG タンパク質に相当する HAWKs サブユニット (コンデンシンでは CAP-G/G2、SMC5/6 では Nse5 ; Table1-1) も複合体-DNA 間相互作用を促進することが示されている (Kschonsak *et al.*, 2017; S. Li *et al.*, 2023; Taschner *et al.*, 2021)。特に、出芽酵母コンデンシンにおいては、STAG に相当する Ycg1 サブユニットが Kleisin との相互作用領域に”Safety belt”とよばれる DNA 結合パッチをそなえており、DNA の安定的なアンカリングに働くことが示されている (Ganji *et al.*, 2018; Kschonsak *et al.*, 2017)。STAG タンパク質にも類似の DNA 結合パッチが存在し、DNA ループ押し出しに必須であることが示されているが (Bauer *et al.*, 2021)、出芽酵母においては、この DNA 結合パッチの変異が DNA ループ押し出し活性を消失させる一方で、トポロジカル結合には影響を与えないことも示されている (Guérin *et al.*, 2024)。

STAG サブユニットは DNA 結合、およびそれを起点とするトポロジカル結合や DNA ループ押し出しといった分子活性において直接的に機能するのみでなく、種々のコヒーシン制御因子とコヒーシンの相互作用の“足場”としても機能する (Fig.1-5)。そのひとつが、コヒーシン解離因子 WAPL である。WAPL は N 末端領域によって、前述のように Pds5 を介してコヒーシンと結合することでコヒーシンをクロマチン上から解離させ、Sororin は WAPL と Pds5 の結合を阻害することで接着を安定化させるが、WAPL の中央領域は Pds5 と独立して STAG タンパク質中央領域の SCD (Stromalin Conserved Domain) と直接結合することも知られている (Ouyang *et al.*, 2013)。また、この結合と競合する形でコヒーシン安定化因子のひとつである Sgo1 も STAG と結合する。Sgo1 はセントロメア周辺にお

いて、PP2A ホスファターゼをリクルートすることで Sororin のリン酸化を阻害し、この領域における接着を分裂中期まで維持することが知られている (Gutiérrez-Caballero *et al.*, 2012)。一方、Sgo1 は前述のように WAPL と競合した STAG との結合により、Sororin と同様 WAPL の直接的な阻害因子として働き得ると考えられている (Hara *et al.*, 2014)。

また、STAG タンパク質はゲノム高次構造形成における CTCF (CCCTC binding factor) とコヒーシンの結合の足場としても働く。結晶構造解析、生化学解析から CTCF はその N 末端領域を SCD と相互作用させることでコヒーシンと結合することが示されており (Li *et al.*, 2020)、細胞内では CTCF とコヒーシンが高頻度で共局在することから、この相互作用によってコヒーシンを CTCF 結合サイトで安定化させ、TAD 境界やループアンカーを形成すると考えられている。CTCF に関しても STAG との相互作用領域を WAPL と共有していることから、他のコヒーシン安定化因子と同様、WAPL と競合することで DNA ループアンカーにおいてコヒーシンの安定化に働くと考えられている (Y. Li *et al.*, 2020; Merkenschlager & Nora, 2016)。以上のように、STAG タンパク質はその DNA 結合能によりコヒーシン分子機能に必須の役割を果たすだけでなく、種々のコヒーシン制御因子の結合を媒介することで、細胞周期を通してコヒーシンの機能制御に寄与している。

1.2.2 コヒーシン分子機能における STAG1/2 の差違

前述のように、脊椎動物の体細胞型コヒーシンは STAG1、STAG2 の 2 種類のパラログを持つ。これらは HEAT リピートから構成される中央領域のアミノ酸配列相同性が 80%以上であり、WAPL や CTCF との相互作用領域は保存されているのに対して、天然変性領域である N 末端および C 末端領域の相同性は 40%以下と顕著に低い。C 末端領域には STAG1、STAG2 どちらもリン酸化修飾部位を持つが、STAG2 はより多くのリン酸化修飾部位をもち、それらが分裂期前期におけるコヒーシンの染色体からの解離に必要であることが示されている (Hauf *et al.*, 2005)。一方で、末端領域のコヒーシン分子機能への寄与や、パラログ間の相違点に関しては検証されていない。

細胞内においては、多くの細胞種で STAG2 が STAG1 よりも過剰に存在しており、HeLa 細胞では 12~15 倍多く STAG2 が存在している (Holzmann *et al.*, 2011, 2019)。一方で、FRAP による解析から、G1 期、G2 期いずれにおいても STAG1 が STAG2 よりも高いクロマチン結合安定性を示すことがヒトおよびマウスの細胞で示されている (Cuadrado *et al.*, 2022; Wutz *et al.*, 2020)。これまでの研究から、

STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシンはいずれも姉妹染色分体間接着を確立できることが示されているが、STAG1 はテロメア領域の接着に、STAG2 はセントロメア領域の接着により中心的に働くことが報告されている (Canudas & Smith, 2009; De Koninck *et al.*, 2020; Remeseiro *et al.*, 2012)。また近年、間期においてもこれらのパラログがゲノム高次構造形成に対して異なった寄与をしていることが示されつつある。STAG1/2 それぞれをターゲットとしたリガンド依存的な細胞内分解により、STAG1 は長距離のゲノム間相互作用や、TAD、A/B コンパートメントの境界形成に寄与していること (Cuadrado *et al.*, 2022; Kojic *et al.*, 2018; Wutz *et al.*, 2020)、STAG2 は局所的な相互作用や組織特異的な遺伝子の発現制御に寄与していることが示された (Cuadrado, Gimé Nez-Llorente, *et al.*, 2019; Kojic *et al.*, 2018; Viny *et al.*, 2019)。さらに、コヒーシン制御因子が与える影響もパラログ間で異なることが報告されている。STAG1 を含むコヒーシンは、STAG2 と比較して Esco1 による SMC3 のアセチル化を受けやすく、クロマチン上で CTCF と共局在しやすい (Cuadrado *et al.*, 2022; Kojic *et al.*, 2018; Wutz *et al.*, 2020)。また、コヒーシンローディング因子である NIPBL の非存在下でも STAG1 のクロマチン結合量は減少しない一方で、STAG2 は結合量を減少させる (Alonso-Gil *et al.*, 2023)。これらは STAG1 コヒーシンと STAG2 コヒーシンのクロマチン結合安定性や、コヒーシン依存的なゲノム高次構造形成に影響すると考えられている一方で、観察される STAG1/2 間の差の要因は明らかになっていない。

1.2.3. 疾患における STAG1、STAG2 の差違

コヒーシンを構成するサブユニットや、コヒーシン制御因子の変異は癌や発達障害などの遺伝子疾患の原因となる。コルネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS) はコヒーシンやその制御因子の変異を原因とする遺伝性疾患の代表例であり、Smc3 の変異や、ローディング因子である NIPBL の変異、コヒーシン脱アセチル化酵素である HDAC8 の変異が報告されている。近年、CdLS 様の遺伝性疾患として Mullegama-Klein-Martinez Syndrome (MKMS) が報告され、STAG2 の変異も原因として多く同定されている (Fig.1-6) (Duff *et al.*, 2025; Mullegama *et al.*, 2018, 2019; Soardi *et al.*, 2017; Yingjun *et al.*, 2015)。STAG1 の変異も発達遅延を伴う遺伝性疾患で報告されているが、その頻度は STAG2 よりも低い (Cipriano *et al.*, 2024; Lehalle *et al.*, 2017)。癌においてもこの傾向は見られ、急性白血病、ユーイング肉腫、膠芽腫など多数の癌で STAG2 はコヒーシン関連因子の中で最も変異頻度が高い (De Koninck & Losada, 2016)。STAG2 の変異頻度が高い原因として、この遺伝子が X 染色体上に存在するため、単一アレルの変異が細胞によりクリ

ティカルな影響を与える可能性が考えられる。一方で STAG2 変異がコヒーシン機能に与える影響とそれに伴う疾患の発病メカニズムに関しては不明な点が多い。

1.2.4 STAG タンパク質の進化的保存性

コヒーシン、コンデンシンの属する SMC タンパク質ファミリーは生物界に広く保存されている。ATP 加水分解活性をもつ SMC タンパク質は原核生物でも報告されており、近年の生化学解析、分子動力的シミュレーションから枯草菌や大腸菌のもつ SMC タンパク質複合体においてもトポロジカルな結合が可能であることが示されており、DNA ループ押出し活性を持つ可能性も示唆されている (Bürmann *et al.*, 2019, 2021; Marko *et al.*, 2019; Niki & Yano, 2016; Nomidis *et al.*, 2022)。これら祖先的な SMC タンパク質複合体は真核生物のもつコヒーシン、コンデンシンと同様に、2 量体化する SMC タンパク質を Kleisin タンパク質が橋渡しする比較的類似した構造をもつ。一方で、枯草菌のもつ Smc/ScpAB や大腸菌の MukBEF といった原始的な Smc タンパク質複合体は non-SMC サブユニットとして HEAT リピートタンパク質を持たず、HAWK s タンパク質の代わりにより小さな KITE と呼ばれるタイプのサブユニットをもつ (Table. 1-1)。HAWK s タンパク質の獲得は進化的に新しく、コヒーシンにおける STAG、NIPBL、Pds5 やコンデンシンにおける CAP-G/G2、CAP-D2/D3 など機能的な多様化を獲得するのは真核生物以降である (Fig.1-7) (Wells *et al.*, 2017)。特に STAG タンパク質の多様化は脊椎動物にのみ見られる特徴であり酵母やショウジョウバエといった原始的な真核生物に関しては単一の STAG オルソログ (Scc3/SA) をもつ (Fig.1-7)。これまでの研究から出芽酵母の Scc3 コヒーシンにおいてもトポロジカル結合や DNA ループ押出しが可能であることが示されているが (Guérin *et al.*, 2024; Murayama & Uhlmann, 2014)、Scc3 が STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシンどちらと機能的、進化的に類似しているのかは不明であり、進化的側面から STAG タンパク質の多様化に関して議論した研究は乏しい。また、酵母やショウジョウバエ、線虫においても細胞内で高次のゲノム構造が観察されているが (Guérin *et al.*, 2024; Hsieh *et al.*, 2015; Jordan Rowley *et al.*, 2020; Mizuguchi *et al.*, 2014; Rowley *et al.*, 2017)、それらの形成メカニズムの進化的保存性は明らかになっていない。

1.3 本研究の目的と結果の概要

本研究では、コヒーシン分子機能におけるコヒーシン構成因子それぞれの機能を明らかにすることを目的とし、コヒーシン-DNA 間相互作用とその安定性を制御し得るヘッドドメインの構造変化と STAG タンパク質、および複合体の構造安定性を制御し得る Scc1 の IDR 領域の長さのコヒーシン分子活性における機能を解析した。

第3章では、本論文の基盤実験となる DNA ループ形成の一分子観察系を確立し、ヘッドドメインの強制的な会合が DNA ループ形成能を顕著に阻害することを明らかにした。細胞内におけるヘッドドメインの強制的な会合は、G1 期においてコヒーシンを過剰に安定化する一方で、適切な染色体分配を阻害し、分裂期から G1 期への移行を遅延させた。これらの結果から、コヒーシンの分子活性および細胞内機能の両面で、ヘッドドメインの構造変化に依存したコヒーシン-DNA 間相互作用の安定性の適切な制御が重要であることが示唆された。

第4章では、コヒーシン複合体の本質的な DNA 結合親和性/安定性を規定する因子として STAG タンパク質に着目し、STAG1/2 の結合安定性の差を中心、パラログ間の機能的差違とその要因となる分子的基盤を明らかにすることを目的として解析を行った。まず、試験管内再構成系と一分子観察系により、STAG1 コヒーシンと STAG2 コヒーシンが同等のトポロジカル結合能をもつ一方で、STAG1 コヒーシンがより高い DNA ループ形成活性と DNA 結合安定性をもつことを明らかにした。さらに、その促進因子として、STAG1 の N 末端 IDR にのみ存在する DNA 結合配列 AT-hook が同定された。AT-hook の変異により、G1 期細胞内で STAG1 のクロマチン結合安定性が減少し、TAD やコンパートメントといったゲノム高次構造が損なわれることが示された。これらの結果と一貫して、AT-hook 変異はコヒーシン安定化因子である Smc3 のアセチル化や CTCF との相互作用も減少させた。一方で、G2 期においては、AT-hook モチーフのコヒーシン安定化への寄与は G1 と比較して低い一方で、Sororin 依存的な安定化により姉妹染色分体間接着の確立に働き得ることが示された。以上の結果から、STAG1 と STAG2 の機能的差違が DNA ループ押出し活性にあることが示され、AT-hook が STAG1 特異的な DNA ループ押出しと DNA 結合安定性の促進因子であり、細胞内においても、種々のコヒーシン安定化因子と共働して、間期ゲノム高次構造形成を促進することが示された。

第5章では、過去の研究から DNA ループ形成活性に重要であることが示されている Scc1 IDR 領域に着目し、その長さがコヒーシンの構造変化に与える影響を解析した。高速原子間力顕微鏡を用いた観察から、IDR 領域の短縮がコヒーシンリング内径を減少させ、コイルドコイルの屈曲を阻害することで複合体全体

の構造変化を阻害することが示された。この結果から、Scc1 のもつ IDR 領域の長さが複合体のダイナミックな構造変化に寄与していることが示された。

本研究から、ヘッドドメインの会合による DNA 結合の過剰な安定化が DNA ループ押し出し活性やコヒーシンの細胞内機能を阻害する一方で、AT-hook モチーフに起因する STAG1 の高い DNA 結合安定性が、効率的な DNA ループ形成やゲノム高次構造形成に必要であることが明らかになった。これらの結果から、DNA を基質とするコヒーシンの分子活性が DNA-コヒーシン間相互作用の安定性の適切な制御に強く依存していることが示唆された。また、AT-hook がトポロジカル結合活性および姉妹染色分体間接着に必要でないことから、共に DNA を基質とする分子活性である接着と DNA ループ形成が異なったメカニズムで制御されていることが強く示唆された。ヘッドドメインと STAG タンパク質が DNA 上のコヒーシン安定化に重要である一方で、Scc1 はそのフレキシブル領域をもってコヒーシンそれ自体の構造変化を制御することでコヒーシン分子活性に寄与していることが示唆され、コヒーシン四量体を構成するサブユニットそれぞれが DNA 結合安定性や構造変化の制御によってコヒーシン分子機能に寄与していることが示された。

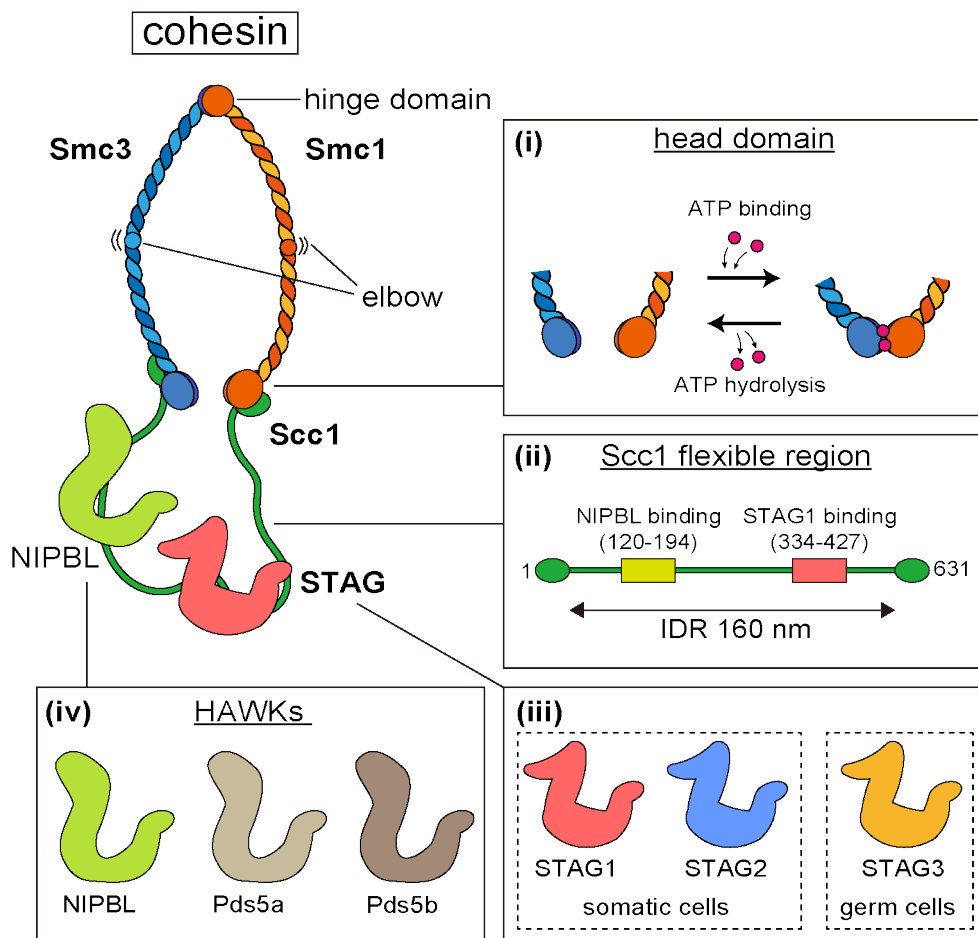


Fig.1-1 コヒーシンの構造

コヒーシンは Smc1、Smc3、Scc1、STAG の 4 つのサブユニットから構成されるリング状のタンパク質複合体である。Smc1/3 のヒンジドメイン、ヘッドドメインを繋ぐ逆平行コイルドコイルはフレキシブルな構造をもち、中央の elbow 領域を起点に屈曲する。ヘッドドメインは ATP 加水分解活性をもち、ATP の結合と加水分解によって会合・解離する (i)。Scc1 は STAG タンパク質や HAWK s タンパク質の結合サイトをもち、長大な天然変性領域によって Smc1/3 を橋渡しする (ii)。Scc1 には相互排他的に STAG1/2/3 が結合する。体細胞においては STAG1 と STAG2 の 2 種類が、生殖細胞においては STAG3 が発現する (iii)。Scc1 にはコヒーシン制御因子としてローディング因子である NIPBL やコヒーシンの安定化と不安定化の両方にはたらく Pds5a/b が結合する (iv)。

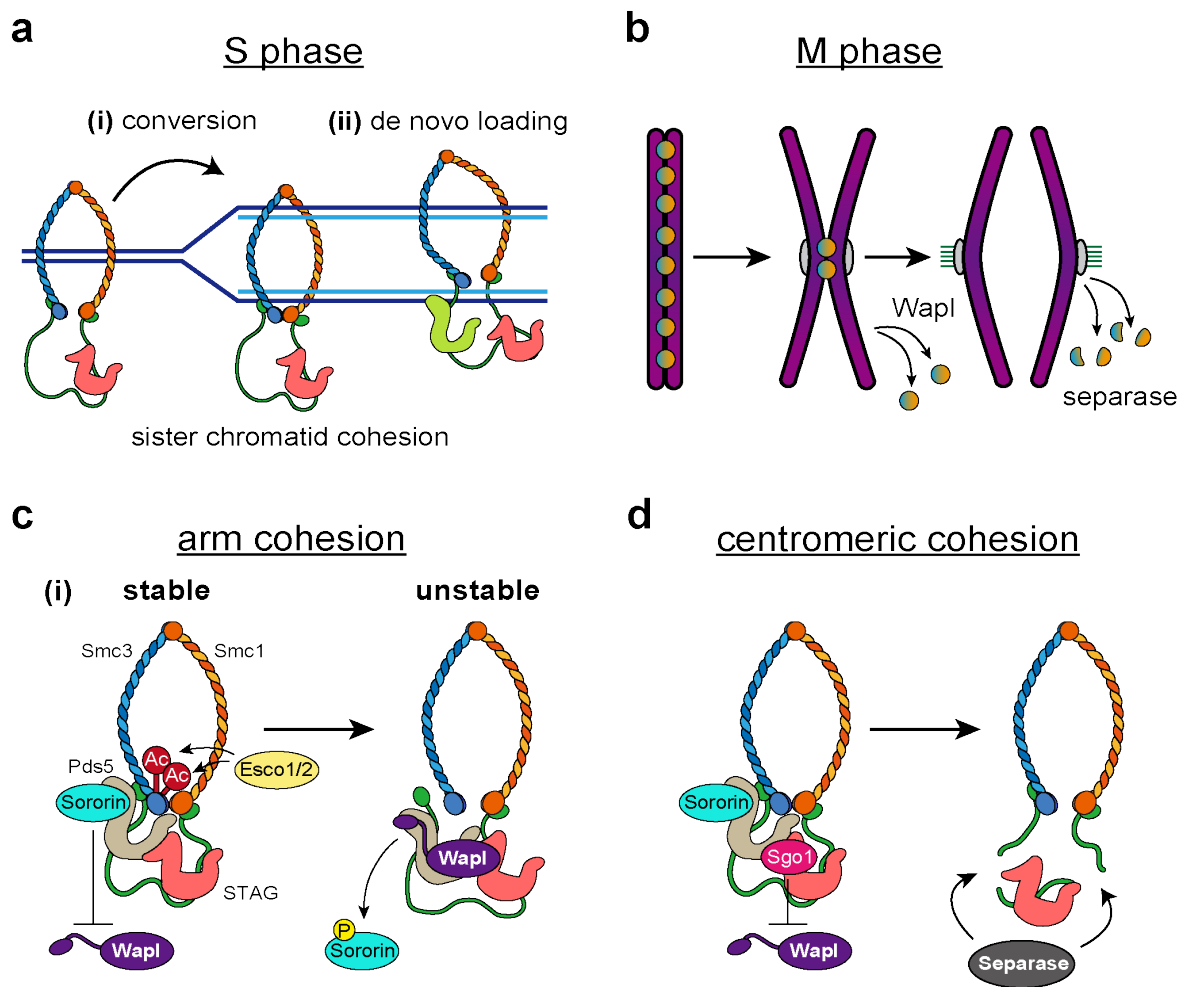


Fig.1-2 コヒーシンによる姉妹染色分体間接着とその制御因子

- コヒーシンによる S 期接着確立。複製以前からクロマチン上に結合したコヒーシンが接着に働く経路 (i) と複製後にローディングされたコヒーシンが接着に働く経路 (ii) によって接着が確立される。
- 有糸分裂期におけるコヒーシンの解離と接着の解消。染色体腕部のコヒーシンが前期に **Wapl** によって解離し、後期に **separase** による **Scc1** の切断でセントロメア周辺のコヒーシンが除去されることで姉妹染色分体間の接着が解消される。
- 染色体腕部のコヒーシンは **Esco1** による **Smc3** のアセチル化と **Sororin-Pds5** の結合によって **Wapl** による解離から保護されることで安定的に接着に働く。**Sororin** がリン酸化されコヒーシンから除去されると **Wapl** が **STAG** および **Pds5** を介してコヒーシンと結合し、コヒーシンの解離に働く。

- d. セントロメア周辺のコヒーシンには Shugoshin (Sgo1) が結合し、Wapl の結合と Sororin のリン酸化を阻害することで接着の維持に働く。これらのコヒーシンは後期に Separase によって Scc1 が切断されることで染色体上から解離し、姉妹染色分体が解離する。

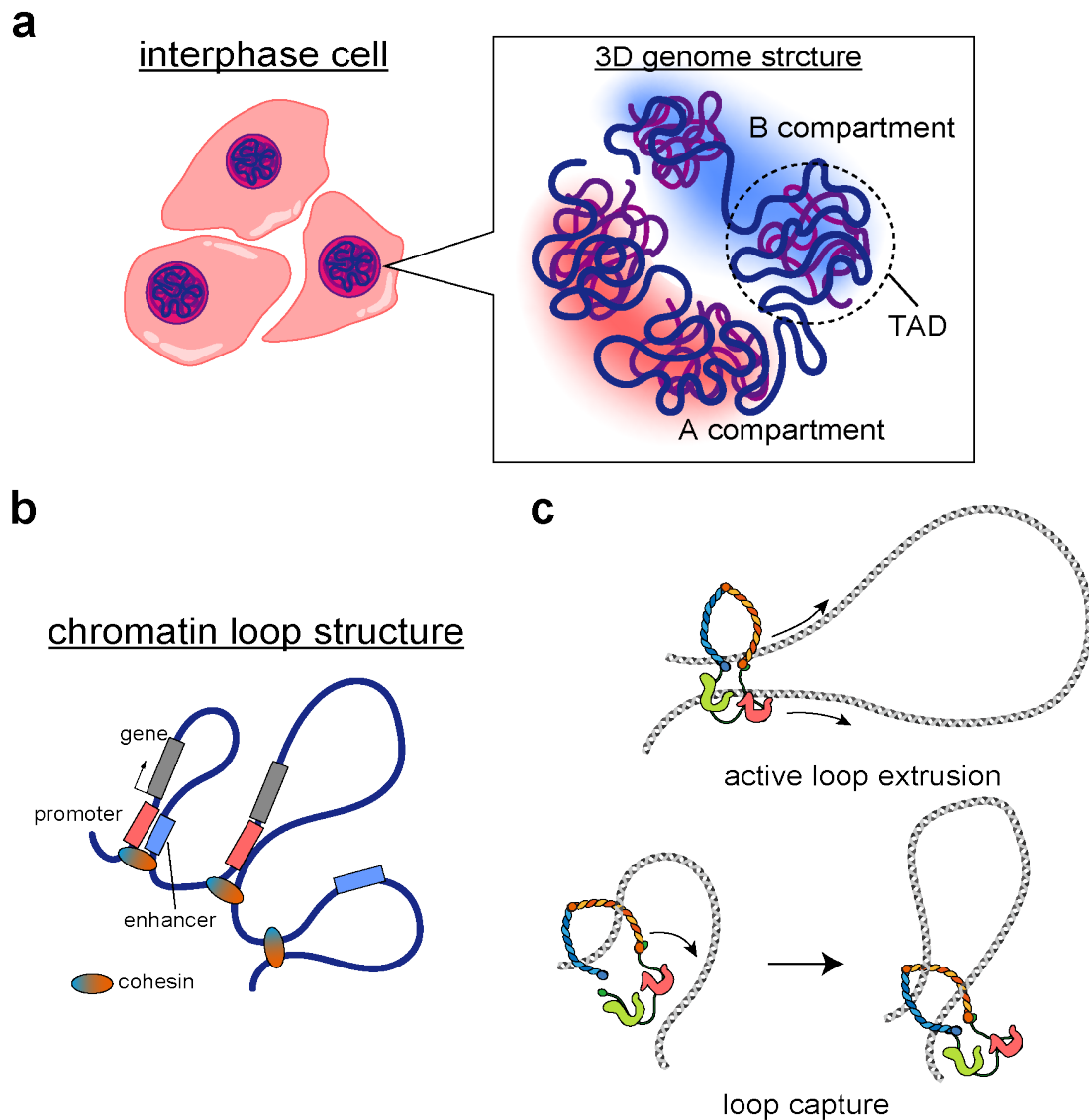


Fig.1-3 コヒーシンによる間期クロマチン高次構造形成

- a.** 間期細胞において、長大なゲノム DNA はコンパクトに折りたたまれることで核内に収納されている。この際生じる高次構造は転写に密接に関わるプログラミングされた構造であり、転写活性の高い A コンパートメント、B コンパートメント、およびその内部の TAD (Topologically Associating Domain) に細分化されることが近年のシーケンシングベースの解析により明らかになりつつある。

- b. TAD を構成するゲノム高次構造の最小単位はクロマチンループ構造であると考えられている。クロマチンループは配列上遠位にあるエンハンサー、プロモーターといった転写エレメント同士を近接させることで転写の活性化に寄与する。また、これらループ構造の形成はコヒーシンに依存しており、ループの基部にはコヒーシンが集積することが示されている。
- c. クロマチンループ形成の分子メカニズムとして考えられているのがコヒーシンのモーター活性によってクロマチンループが押出されるという **loop extrusion** モデルである。一方で、コヒーシンが姉妹染色分体間接着に働く際と同等のメカニズムで 2 本目の DNA を捕捉するというモデルも存在しており、クロマチンループ形成のメカニズムに関しては統一見解に至っていない。

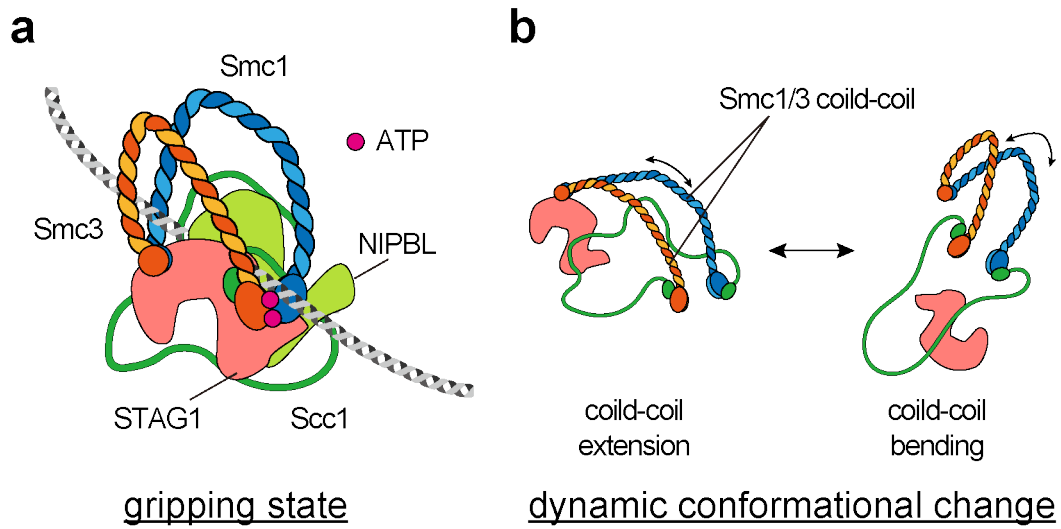


Fig.1-4 コヒーシン分子活性に関わる複合体の構造変化

- a. ATP 結合状態のコヒーシンは、ローディング因子 NIPBL および複合体内の DNA 結合領域によって DNA と安定的に相互作用する “gripping 状態” を取る。
- b. Smc1/3 ヘッドドメイン、ヒンジドメイン間を繋ぐ逆平行コイルドコイルは柔軟な構造を取り、伸展と屈曲をダイナミックに行き来する。この構造変化を基盤とする複合体全体の構造的自由度の高さが DNA ループ押出し活性に密接に関わると考えられている。

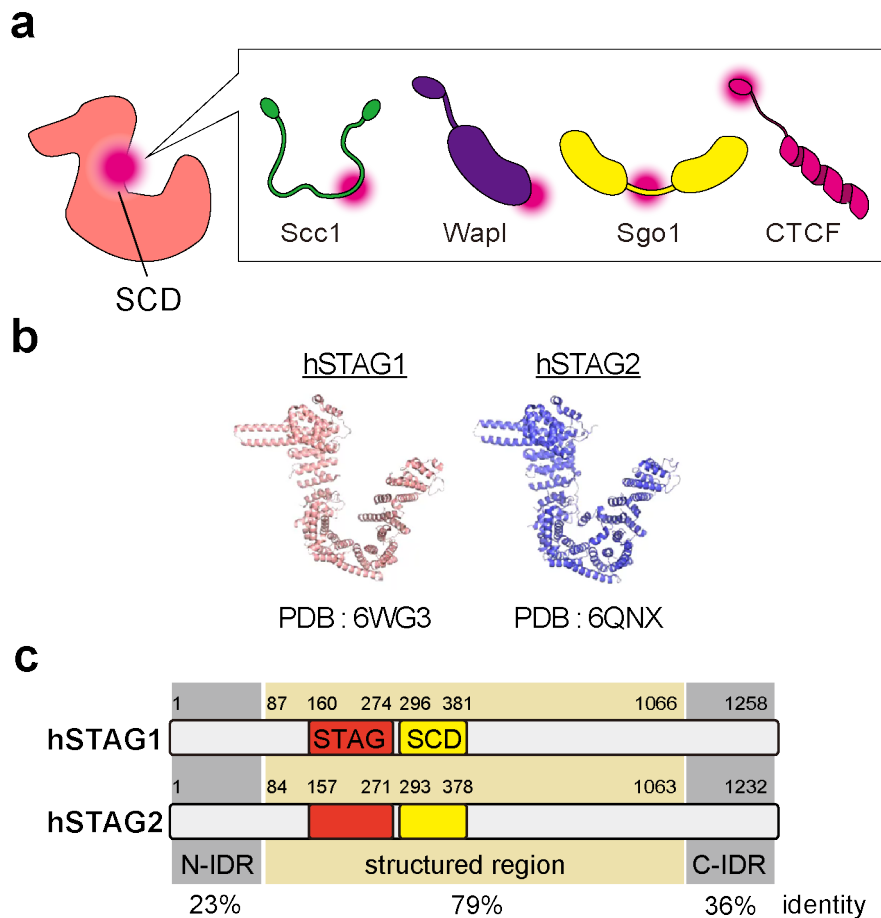


Fig.1-5 STAG タンパク質の構造

- a.** STAG タンパク質を足場とするコヒーシン制御因子。STAG タンパク質は中央領域の SCD (Stromalin Conserved Domain) をもって種々のコヒーシン制御因子と相互作用する。Scc1 は IDR の中央領域を、Wapl は C 末端領域を、Sgo1 は中央領域を、CTCF は N 末端領域を介して SCD と相互作用することが、構造解析により示されている。
- b.** STAG1 と STAG2 の構造。構造を持つ中央の HEAT リピート領域を示す。これら構造化領域に関しては STAG1/2 間で差ほとんどみられない。
- c.** STAG1 と STAG2 の配列相同性。STAG ドメイン、SCD を含む中央の構造化領域は両方で配列保存性が高い。その一方で N 末端、C 末端の天然変性領域の配列保存性は著しく低い。

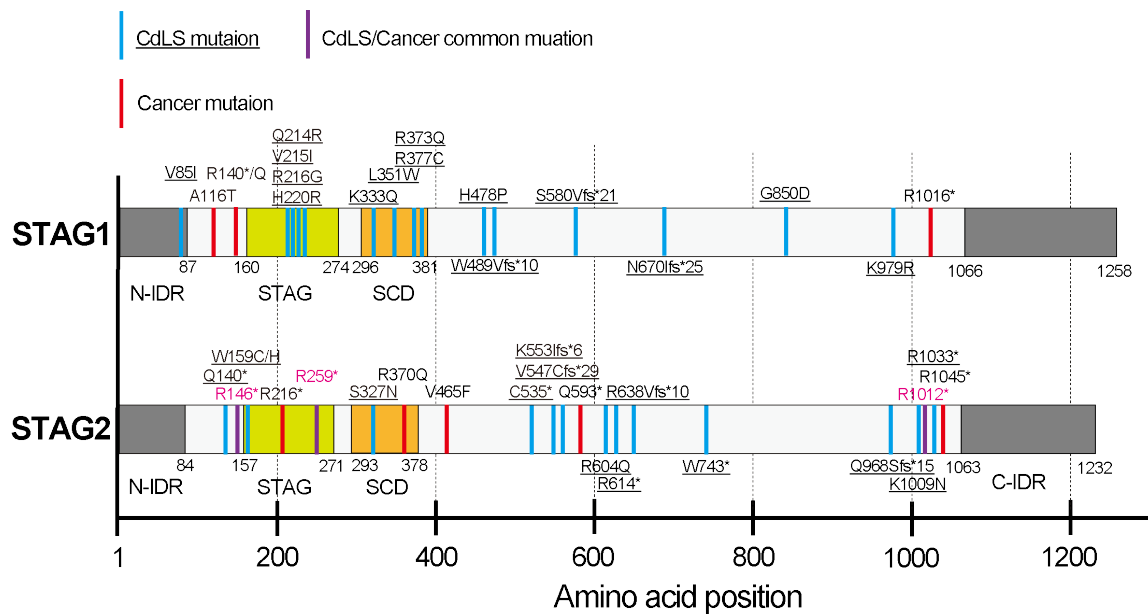


Fig.1-6 STAG1/2 で報告されている疾患関連変異

STAG1 および STAG2 で報告されている疾患関連変異のマッピング。水色で示したのは MKMS (Mullegama-Klein-Martinez Syndrome) を含む CdLS (コルネリア・デ・ランゲ症候群) 様の遺伝性疾患において報告されている全変異である。さらに、癌で報告頻度の高い変異を赤色で、癌及び遺伝性疾患の両方で報告されている変異を紫色で示した。変異は STAG1、STAG2 のいずれにおいても STAG ドメインや SCD に多く見られる。

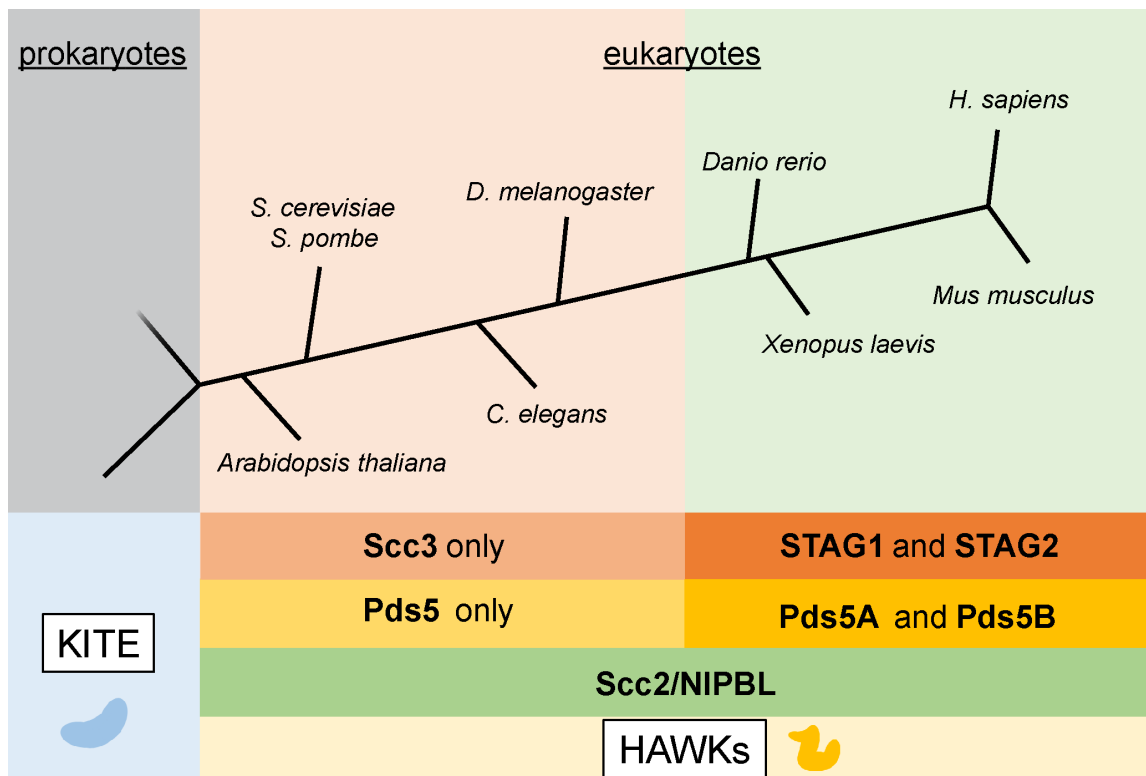


Fig.1-7 HAWKs サブユニットの進化的保存性

原核生物は SMC タンパク質複合体のサブユニットとして HAWKs を持たず、KITE と呼ばれる小分子量のタンパク質を有する。真核生物で STAG や Pds5 パラログを獲得するのは脊椎動物以降であり、それ以前の無脊椎動物群は Scc3、Pds5 にパラログを持たない。

organism group		prokaryote		eukaryote			
Smc complex		Smc/scpAB	MukBEF	Smc5/6	condensin I	condensin II	cohesin
non-Smc subunits	Smc	Smc	MukB	Smc5	Smc2		Smc1
				Smc6	Smc4		Smc3
	kleisin	ScpA	MukF	Nse4	CAP-H/Brn1	CAP-H2	Scc1
	HAWKs			Nse5	CAP-G/Ycg1	CAP-G2	STAG/Scc3
				Nse6	CAP-D2/Ycs4	CAP-D3	NIPBL
	KITE	ScpB	MukE	Nse1			
				Nse3			

Table.1-1 SMC タンパク質複合体とそのサブユニット群

第2章 材料と方法

細胞の培養

組み換えタンパク質の精製には *Spodoptera frugiperda* (ツマジロクサヨトウ) から分離された卵巣細胞である Sf21 (IPLB-Sf21-AE) を用いた。Sf21 細胞の培養には 100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Wako) を添加した PSFM-J1 medium を用い、27°C で培養を行った。ヒト細胞を用いた観察には、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 (CCL-247) を親細胞株として用いた。実験内で用いられた HCT116 細胞は全て、37 °C、5% CO₂ に設定したインキュベーター内で培養し、McCoy's5A Medium (ThermoFisher) に 10% の非働化したウシ血清 (GIBCO)、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Wako) を混ぜた培地を使用した。

CRISPR-Cas9 法によるゲノム編集

第二章で用いた STAG1-FKBP12F36V-mCherry2/STAG2-mAID-mClover ノックイン細胞株の樹立には CRISPR/Cas9 法による遺伝子編集を用いた。6 ウェルプレート上の細胞に対し、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher) を用いて CRISPR/Cas9 とドナー・プラスミドをトランスフェクションした。FKBP12F36V-mCherry2 および mAID-mClover タグの挿入には、以下のガイド DNA を用いた。STAG1-C (forward: 5'-caccggtcatcattttctagggatt-3', reverse: 5'-aaacaatccctagaaaaatgatgac-3')、STAG2- (forward: 5'-caccgtctctctcattaggttct-3', reverse: 5'-aaacagAACCTAATGAGAGAGAGA-3')。トランスフェクション 72 時間後から、0.7 mg/ml G418 (Roche) および 0.1 mg/ml HygroGold (InvivoGen) による薬剤選択を開始し、10-12 日後にコロニーをピックアップし 96 well プレートにて培養した。増殖した細胞を回収後、PCR によって目的の細胞を選別した。

得られた STAG1/2 ダブルデグロン細胞に対して、STAG1-WT-Halo 遺伝子、または STAG1-RA-Halo 遺伝子をリポフェクションにより導入した。ドキシサイクリン誘導性の外来性 STAG1 遺伝子を Lipofectamine 3000 により導入し、6 µg/ml ブラストシジン S (Wako) でコロニーを選別し、ウェスタンブロッティングによって目的のクローンを選別した。

各細胞株の内在性 STAG2 分解効率を高めるため、OsTIR1^{F74G} 遺伝子をレンチウイルスにより導入した。ウイルス上清は HEK293T 細胞で産生し、8 µg/ml ポリブレン存在下で HCT116 細胞に添加したのち、400 µg/ml Zeocin (InvivoGen) で細胞の選別を行った。3 日以上培養の後、さらに 5-ph-IAA (Sigma) の添加により STAG2 が効率的に分解されている集団のみをセルソーター (SONY SH800HS) を用いて選別した。100nM 5-ph-IAA 添加の 4 時間後にソーティングを

行い、mClover 蛍光が完全に消失している集団のみを選別した。

外来性 STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo の発現誘導と、内在性 STAG1 および STAG2 の分解を行うため、細胞を 2 $\mu\text{g/ml}$ ドキシサイクリンハイクレート (Sigma) で 24 時間、500 ng/ml dTAGV-1 (Wako) で 4 時間、さらに 100 nM 5-Ph-IAA で 4 時間処理した。

細胞周期の同調

ヘッド会合型コヒーシン発現細胞の G1 期への同調は、10 μM RO-3306 (Millipore) で 18 時間処理後、330 nM Nocodazole を含む培地中にリリースし、2 時間培養した後、2 mM thymidine (Sigma) を含む培地中で 3 時間培養することで行った。G2 期への同調は、10 μM RO-3306 を含む培地中で 20 時間培養することで行った。STAG1/2 ダブルデグロン細胞の G1 期への同調は、細胞を 660 nM nocodazole で 22 時間処理した後、2 mM thymidine を含む培地中で 8 時間培養することで行った。G2 期への同調には、10 μM RO3306 を含む培地中で 20 時間培養することで行った。

セルソーターを用いたソーティングおよび細胞周期解析

STAG1WT-Halo および STAG1RA-Halo 発現細胞を用いた実験のうち、iFRAP を除くすべての実験は、外来遺伝子の発現レベルを揃えるため、FACS によるソーティングと組み合わせて行った。細胞を 100 nM HaloTag リガンド Janelia Fluor® 646 (Promega) で 6 時間標識し、PBS で洗浄後、トリプシン処理で回収し PBS に再懸濁し、FACS に用いた。FACS には SONY SH800HS を使い、640 nm レーザーで STAG1WT/RA-Halo-JF646 のシグナルを検出した。JF646 陽性細胞をゲーティングし、死亡細胞およびダブレットを除外し、10% FBS を含む McCoy's 5A 培地中にソートした。

細胞周期解析には、同調した細胞をトリプシン処理で回収し、1 ml の PBS に懸濁し、100% エタノール 5 ml を加えて固定したものを用いた。4°Cで一晩インキュベート後、1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (同仁化学) および 0.1% Triton X-100 を含む PBS 1 ml に再懸濁した。DNA 含量は 405 nm レーザーを用いて解析し、得られたデータは SONY cell sorter ソフトウェアおよび Floreada.io を用いて解析した。

RNAi による Sororin の分解

Sororin siRNA はセンス配列 GCCUAGGUGUCCUUGAGCUtt を、コントロール (GL2) siRNA はセンス配列 CGUACGCGGAAUACUUCGAtt を用いた。siRNA を RNAiMax (Thermo Fisher) とあらかじめ混合し、メーカーのプロトコルに従って調製した後、培地中に添加して 24 時間インキュベートした後、実験を行った。

コヒーシンの発現及び精製

本研究で用いた組換えヒト三量体コヒーシン (Scc1-Halo, Smc3-FLAG, Smc1)、四量体コヒーシン (10×His-STAG1/STAG2/STAG1RA/STAG2AT, Scc1-Halo, Smc3-FLAG, Smc1)、ヘッド会合型コヒーシン (10×His-STAG1, Scc1-Halo, Smc3-FRB*-3FLAG, Smc1-FKBP-3HA) および Scc1 短縮型コヒーシン (10×His-STAG1, Scc1short-Halo, Smc3-FLAG, Smc1) の発現には、Sf21-バキュロウイルス得発現系を用いた。各タンパク質を pAceBac1 ベクターにクローニングし、バキュロウイルス感染により Sf21 細胞に導入した。ウイルス感染後 65 時間で細胞を回収し、精製に用いた。回収した細胞のペレット 1ml に対して 3ml の CytoBuster (Millipore) で懸濁、破碎し、cOmplete EDTA-free プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche)、0.2% Tween-20、0.5 mg/ml PMSF を添加して 4°C で 45 分間インキュベートした。その後、15,000 rpm で 10 分間遠心し、得られた上清を 4°C で 2.5 時間、100 µl の抗-FLAG M2 ビーズ (Sigma-Aldrich) とインキュベートした。三量体コヒーシンについては、樹脂を Buffer A (25 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl、10% グリセロール、0.5% Tween-20) で洗浄し、結合タンパク質を 16 µM HaloTag Alexa Fluor 488 リガンド (Promega) 存在下で 4°C、1 時間標識した。標識したタンパク質は、0.2 mg/ml 3×FLAG ペプチドを加えた Buffer A で 6 時間溶出し、その後 Buffer A に透析した。四量体コヒーシンについては、0.2 mg/ml 3×FLAG ペプチドを加えた Buffer A で 6 時間溶出し、FLAG 溶出画分を 4°C で一晩 Ni²⁺-NTA アガロースビーズ (Thermo Fisher) とインキュベートした。結合したコヒーシンは 16 µM HaloTag Alexa Fluor 488 リガンドとともに 4°C、1 時間インキュベートして標識した。標識後、Ni Buffer B (25 mM potassium phosphate pH 7.4、150 mM KCl、200 mM イミダゾール、10 % グリセロール) で溶出し、ピーク画分を Buffer A に透析した。ビーズを洗浄後、FLAG ペプチドで溶出し、得られた上清を Ni-NTA ビーズと混合し o/n でインキュベートした。回収したビーズを洗浄後、200 mM イミダゾールを含むバッファーで溶出した。透析により塩濃度を調整し、SDS-PAGE、SYPRO-Ruby による染色によって精製タンパク質を確認、定量した。

NIPBL-Mau2 複合体の精製

FLAG タグ、His タグを融合した NIPBL-Mau2 複合体を Sf21-バキュロウイルス発現系を用いて発現させた。細胞回収後、1 ml の細胞ペレットに対して 1 mM PMSF, 2 mM benzamidine, 10 µl/ml aprotinin, and cOmplete EDTA-free を添加した 3 ml の Buffer 1 (25 mM sodium phosphate, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 0.05% Tween-20) に懸濁し、Dounce ホモジナイザー (20 ストローク) で破碎した。15,000 rpm、45 分間の遠心後、上清を回収し、得られた上清を 4°C で 2.5 時間、150

μ l の抗-FLAG M2 ビーズ (Sigma-Aldrich) とインキュベートした。ビーズを Buffer2 (25 mM sodium phosphate pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% グリセロール, 0.01% Tween-20) で 3 回洗浄した後、0.1 mg/ml 3 $\times$ FLAG ペプチドを加えて 4°C、2 時間インキュベートし、結合タンパク質を溶出した。

得られた溶出画分を HisTrap HP カラム (GE Healthcare) に AKTA クロマトグラフィシステムにロードし、22.5 mM イミダゾールを含むバッファーで洗浄したのち、300 mM イミダゾールで溶出した。ピーク画分 (約 2 ml) を回収し、Vivaspin 20 超遠心濃縮ユニット (100 kDa MWCO ; Sartorius) を用いて約 200 μ l まで濃縮した。

一分子観察用カバーガラスの調製とマイクロ流路の作製

一分子観察用のカバーガラスには、松浪の No.1-S (22 x 22 mm)を用いた。まず、カバーガラスを 1 M KOH 中で 20 分間超音波洗浄し、超純水で十分に洗浄した後、メタノール中で再度超音波洗浄した。カバーガラスを 2% (v/v) 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich) 溶液中に室温で 1~3 日間インキュベートした。カバーガラスを 100 mM NaHCO₃ に 100 mg/ml methoxy-PEG-succinimidyl valerate (mPEG-SVA-5K; Laysan Bio) および biotin-PEG-succinimidyl valerate (Bio-PEG-SVA-5K; Laysan Bio) を加えた溶液中で、室温で 3 時間インキュベートし、洗浄、乾燥後、使用まで -80°C で保存した。

マイクロ流路は、2 mm 径の十字に切り抜いた両面テープをチューブの接続が可能なスライドガラスに貼り付け、カバーガラスによりサンドイッチすることで作製した。チューブ接続用の穴から観察前に、80 μ M ストレプトアビジン (Sigma-Aldrich) を添加した ELB Buffer (10 mM HEPES-KOH, pH 7.7, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, and 1 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich)) を流路内に流し、20 分以上インキュベートしアビジンコーティングを行った。その後、Buffer 流入用のチューブ (Natsume, KN-392-1-SP-19)、Buffer 排出用のチューブ (KN-392-1-SP-55) を接続し、ELB buffer で流路内を洗浄した後、実験に用いた。

ビオチン化 λ DNA の調製

ビオチン化 λ DNA (New England Biolabs) は、両端の COS 末端にビオチン化オリゴヌクレオチドをライゲーションすることで調製した。まず、 λ DNA と 2 種類のビオチン化オリゴヌクレオチド (oligo #1: 5'-GGGCGGCGACC[biotinylated-T]-3'; oligo #2: 5'-AGGT[biotinylated-T]CGCCGCCC-3') を、ATP 存在下で 37°C、3 時間 T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) 処理し、リン酸化した。その後、片側の末端のビオチン化標識のため、oligo #1 を T4 ライゲーションバッファー (New England Biolabs) 中で λ DNA にアニーリングし、65°C から 10°C

まで徐冷した後、T4 DNA ligase (New England Biolabs) を用いて 16 °C、2 時間ライゲーションした。続いて、同じ手順で oligo #2 を反対側の末端にアニーリングおよびライゲーションし、両末端をビオチン化標識した。

全反射蛍光顕微鏡による DNA ループの一分子観察

ELB buffer で洗浄したマイクロ流路に、ビオチン化 λ DNA を最終濃度 11.5 pM となるよう DNA バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.25 mg/ml BSA) に溶解し、22 nM SYTOX Orange (Thermo Fisher Scientific) を添加後、垂直方向のチャンネルに注入した。DNA は 2 μ l/min で 5~10 分間流し、カバーガラス表面にテザリングした。未結合の λ DNA は、イメージングバッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5、50 mM NaCl、3 mM MgCl₂、5 mM ATP、5% グリセロール、0.25 mg/ml BSA、22 nM SYTOX Orange) を 10 μ l/min で 2 分間流すことで除去した。その後、フロー方向を垂直チャンネルから水平方向のチャンネルに切り替え、30 μ l/min のフローで DNA を伸張した。DNA ループ形成を誘導するため、流路内に、1.5 nM のコヒーシンと 0.75 nM の NIPBL-Mau2 を添加した。DNA は 561 nm のレーザーで、コヒーシンは 488 nm のレーザーによって可視化し、室温で 15 秒毎 (第一章) または 5 秒毎 (第二章) で 20 分間撮影した。

コヒーシン拡散の一分子観察では、水平方向のチャンネルのみを用いた。DNA を 50 μ l/min で流路内に添加後、流速を 100 μ l/min にすることで DNA を直線上に伸展してガラス上に貼り付けた。その後、1.5 nM のコヒーシンと 2 nM の NIPBL-Mau2 を 10 μ l/min で添加し、5 分間のインキュベートの後、high-salt buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5% glycerol, 0.25 mg/ml BSA, 22 nM SYTOX Orange) によって流路内を洗浄後、ATP を添加した high-salt buffer、もしくは ATP を除去した high-salt buffer に置換し、DNA 上のコヒーシンの拡散を 100 msec 毎に 30 秒間撮影した。各条件で 25 分子のコヒーシンを解析し、平均二乗変位 (MSD) を以下の式から決定した。

$$\text{MSD}(N, n) = \frac{1}{N - n} \sum_{i=1}^{N-n} (x_{i+n} - x_i)^2$$

ここで、N は総フレーム数 (N=300) 、 Δt はフレーム間の時間間隔であり ($\Delta t = 0.1$ s)、MSD 値はタイムラグ ($n\Delta t$) の関数としてプロットした。拡散係数 D は、MSD データを以下の異常拡散方程式にフィッティングすることで求めた。

$$\text{MSD}(t) = 2Dt^\alpha$$

画像取得および粒子トラッキングは NIS-Elements (Nikon) を用いて行い、MSD

解析およびフィッティングは Prism9 ソフトウェアを用いて行った。

コヒーシンの単一分子蛍光強度を決定するブリーチングアッセイでは、1 nM の Alexa488 標識コヒーシンをカバーガラス表面に非特異的に結合させた。蛍光標識されたタンパク質を 3.5 mW の 488 nm レーザーでフォトブリーチングし、ブリーチングステップを検出するため 0.5 秒ごとに画像を取得した。ステップサイズは、各ブリーチングイベントについて、シグナル消失前後のそれぞれ 5 フレーム分の平均蛍光強度の差分として算出した。

ラジオアイソトープを用いた ATP 加水分解活性の定量

ATP 加水分解アッセイでは、200 nM のコヒーシン複合体を、reaction buffer (35 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM TCEP、25 mM NaCl、1 mM MgCl₂、0.003% Tween-20、0.1 mg/ml BSA、10 nM [γ -³²P]ATP、25 μ M 非標識 ATP) 中で、150 nM NIPBL-Mau2 および 10 nM λ DNA を加えて 37 °C でインキュベートした。反応は 0.3 M EDTA の添加により停止させ、反応産物をポリエチレンイミンプレート (Merck) 上で薄層クロマトグラフィーにより分離した。展開溶媒として 0.75 M KH₂PO₄ (pH 3.4) を用いた。分離後、Typhoon FLA9000 スキャナー (GE Healthcare) によるイメージングののち、Fiji ソフトウェアを用いて定量解析を行った。

ライブセルイメージングと iFRAP 解析

ライブセルイメージングは、細胞を 8 ウェルガラス底チャンバー (IWAKI) 内で培養することで行った。ヘッドドメイン会合型コヒーシン発現細胞の分裂期細胞のイメージングでは、8 ウェルチャンバー内で培養した細胞を RO3306 で 20 時間処理しリリース後、観察を行った。ヘッドの強制的な会合は、観察の 2 時間前に 1.5 μ M の AP21967 を添加することで誘導した。また、観察の 10 分前に 5 μ g/ml Hoechst 33342 を添加することで核 DNA を染色した。

STAG1-WT/RA-Halo 発現細胞のライブセルイメージングでは、100 nM HaloTag リガンド JF646 で 6 時間標識し、イメージング 10 分前に 5 μ g/ml Hoechst 33342 を添加することで核 DNA を染色した。撮影は、共焦点ユニット CSU-W1 (Yokogawa)、EMCCD カメラ iXon Ultra 888 (Andor)、40 $\times$ Plan-Fluor 対物レンズ (NA 1.30, Nikon) を備えた Nikon Ti2-E 顕微鏡で行った。

iFRAP (inverse fluorescence recovery after photobleaching) 実験は、上述の方法で G1 または G2 に同調した細胞を用いて行った。細胞は LX83-FV3000 (OLYMPUS) 共焦点顕微鏡上で、60 $\times$ Plan-Apochromat 対物レンズ (PLAPON60XOSC2) を用いて撮影した。ヘッドドメイン会合型コヒーシン発現細胞の iFRAP では、選択した 10 細胞に対して、Scc1-mAID-mClover を 488 nm レーザーを用いて核の半分の領域をブリーチし、ブリーチ後 120 分間、2 分ご

とにブリーチ領域の蛍光の回復をモニターすることで解析した。

STAG1-FKBP-mCherry2 および STAG2-mAID-mClover の iFRAP では、選択した 10 細胞に対して、STAG1 には 561 nm レーザー、STAG2 には 488 nm レーザーを用いて核の半分の領域をブリーチし、ブリーチ後 120 分間、2 分ごとにブリーチ領域の蛍光の回復をモニターすることで解析した。

STAG1-WT/RA-Halo の iFRAP では、観察前に細胞を 2 μ g/ml doxycycline hyclate (Sigma-Aldrich) で 24 時間することで発現を誘導し、さらに 500 ng/ml dTAGV-1 で 4 時間処理することで内在性の STAG1 を分解させた。その後、STAG1WT- または STAG1RA-Halo を 100 nM JF646 で 1 時間標識し、PBS で洗浄したのち、JF646 を含まない 37°C に予温した McCoy's 5A 培地に交換した。選択した 10 細胞に対し、640 nm レーザーで核の半分の領域をブリーチし、ブリーチ後 120 分間、2 分ごとにブリーチ領域の蛍光の回復をモニターすることで解析した。

ブリーチ領域および未ブリーチ領域の蛍光強度は Fiji を用いて定量し、細胞の移動は Fiji の Template Matching プラグインで補正した。時間経過に伴う蛍光強度の回復は、Prism 9 (GraphPad) を用いて以下の双指数関数にフィッティングした：

$$F(t) = \text{Span}^{\text{fast}} (1 - \exp(-k_{\text{fast}} * t)) + \text{Span}^{\text{slow}} (1 - \exp(-k_{\text{slow}} * t))$$

滞在時間 (residence time, τ) は $\tau = 1/k_{\text{off}}$ と定義されるため、上式に対応して $k_{\text{off}}^{\text{fast}}$ および $k_{\text{off}}^{\text{slow}}$ に対応する 2 種類の滞在時間 τ^{fast} と τ^{slow} が得られる。結合画分は、フォトブリーチング後に未ブリーチ領域で失われた蛍光シグナルを可溶性画分として見積もった。動的なクロマチン結合画分の割合は、以下の式により算出した：

$$\frac{\text{Span}^{\text{fast}}}{\text{Span}^{\text{fast}} + \text{Span}^{\text{slow}}} \times 100$$

染色体スプレッド

細胞を 2 μ g/ml ドキシサイクリンで 24 時間処理し、その後 500 ng/ml dTAGV-1、100 nM 5-Ph-IAA、100 nM JF646 を加えて 8 時間処理した。続いて、4 時間の nocodazole 処理により細胞を分裂期に停止させた。STAG1WT/RA の発現レベルをそろえるため、FACS により細胞をソーティングした。ソーティング後、細胞を低張バッファー (0.75 M KCl) 中で処理し、Carnoy 固定液 (70% メタノール、30% 酢酸) で固定した。染色体をカバーガラス上に播種し、Giemsa 染色液 (Merck) で 9 分間染色したのち、水道水で洗浄し、乾燥後 Entellan New (Merck) で封入した。

クロマチン画分の調製とクロマチン免疫沈降

G1 または G2 に同調した細胞について、STAG1WT-Halo と STAG1RA-Halo の発現レベルを揃えるため、まず FACS によりソーティングを行い、ソーティング後、細胞を lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.2% NP-40) 中で溶解した。全細胞抽出物 (whole-cell extract) を調製するため、一部を 0.2 U の Benzonase (Merck) で 4°C、30 分間処理した。クロマチン画分調製のため、細胞を 2,000 × g で 10 分間遠心し、得られたペレットを同じバッファで 5 回洗浄した。

クロマチン免疫沈降では、まず 10 µl の Protein A 磁気ビーズ (Veritas) に抗 Smc3 抗体 2.5 µg、あるいはコントロールとしてウサギ IgG をあらかじめ結合させた。クロマチンペレットは 0.5 U の Benzonase で 4°C、30 分間処理した後、抗体結合ビーズと 4°C で 2 時間インキュベートした。ビーズは洗浄バッファ (10 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、0.05% Tween-20) で 3 回洗浄し、Laemmli サンプルバッファに懸濁して加熱変性したのち、上清を SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングにより解析した。

Micro-C サンプル調製

細胞を前述の方法で G1 期に同調し、2 µg/ml ドキシサイクリンで 24 時間、さらに 500 nM dTAGV-1 および 100 nM 5-ph-IAA を 8 時間処理した。STAG1-WT/RA-Halo または STAG1-RA-Halo 陽性細胞を FACS でソーティングし、直ちに Micro-C サンプル調製に用いた。

ソーティングした細胞をフレッシュに調製した 1%ホルムアルデヒド (Polysciences) 中で、室温で 10 分間固定した。反応は 2.5 M グリシンを添加して 5 分間インキュベートすることで停止した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.3 M disuccinimidyl glutarate (DSG; Thermo Fisher) を用いて室温 45 分間、第二段階のクロスリンクを行い、再び 2.5 M グリシンを 5 分間添加して反応を停止した。得られた細胞ペレットを Micro -C buffer #1 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.2% NP40, 1x cOmplete EDTA-free (Roche)) に懸濁し、氷上で 20 分間インキュベートした。続いて、4°C、5,000 × g で 5 分間遠心し、得られたクロマチンに micrococcal nuclease (MNase; New England Biolabs) 3,000 gel units を添加後、37°C で 10 分間処理した。反応は 2 mM EGTA を添加し、65°C で 10 分間インキュベートすることで停止させた。4°C、5,000 × g で 5 分間遠心し、ペレットを氷冷した Micro-C buffer #22 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) で洗浄した。その後、クロマチンを Micro-C end-repair mix (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 100 µg/ml BSA, 4 mM ATP, 5 mM DTT) に懸濁し、さらに DNA Polymerase I, Large (Klenow)

Fragment (New England Biolabs) 40 U と T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) 200 U を加え、37°Cで 1 時間インキュベートした。ビオチン標識のため、biotin-dATP (Jena Bioscience)、biotin-dCTP (Jena Bioscience)、dGTP (Promega)、dTTP (Promega) をそれぞれ 66 μ M となるよう加え、25°Cで 1 時間インキュベートした。反応は 30 mM EDTA を添加し、65°Cで 20 分間インキュベートすることで停止した。クロマチンを 4°C、10,000 $\times$ g で 5 分間遠心し、ペレットを ligation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT) で 2 回洗浄した後、近接領域のライゲーションのため、クロマチンを 2,000 U の T4 DNA ligase (New England Biolabs) を含む ligation buffer に懸濁し、室温で 3 時間インキュベートした。ライゲーション後、クロマチンを 4°C、10,000 $\times$ g で 5 分間遠心し、ペレットを 200 U の Exonuclease III (New England Biolabs) を添加した NEBuffer 1 (New England Biolabs) に懸濁し、37°Cで 15 分間インキュベートして、ライゲーションされていない末端上のビオチン-dNTP を除去した。続いて 750 μ g の Proteinase K (Roche) および 0.14% SDS を加え、55°Cで 2 時間インキュベートした後、65°C o/n でリバースクロスリンクを行った。DNA は QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。

ビオチンプルダウンのため、5 μ l の Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 ビーズ (Invitrogen) を 300 μ l の Tween wash buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.5、0.5 mM EDTA、1 M NaCl、0.05% Tween-20)で 2 回洗浄した。精製 DNA を、300 μ l の binding buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.5、0.5 mM EDTA、1 M NaCl) に懸濁したビーズと混合し、室温で 20 分間インキュベートした。その後、ビーズを Tween wash buffer で 2 回洗浄した。ライブラリー調製は、NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs) を用い、メーカーのプロトコルに従いビーズ上で行った。アダプターライゲーション後、ビーズを Tween wash buffer で 2 回洗浄し、NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (New England Biolabs) を用いて PCR 増幅を行った。最終的な PCR 産物は AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter) で精製した。シーケンシングおよびデータの解析は、Spanish National Cancer Research Centre (CNIO) の Ana Losada 教授、Daniel Giménez 研究員に行っていた。

コヒーシン複合体の HS-AFM 観察

高速原子間力顕微鏡観察は京都大学 ICEMS 物質-細胞統合システム拠点の杉山弘教授、日高久美さんに行っていた。当研究室で精製した 1.5 nM の野生型 Scc1 コヒーシンおよび Scc1^{short} コヒーシンを AFM 観察 Buffer (10 mM HEPES pH7.7, 150 mM KCl, 2 mM ATP, 2.5 mM MgCl₂) に添加し、AFM 観察に用いた。撮影は 0.5 frame/sec で行い、得られた画像は Fiji によって解析した。

第3章 コヒーシン分子機能におけるヘッドドメイン構造変化の重要性

3.1 緒言

トポロジカル結合活性や DNA ループ押出し活性といったコヒーシンの分子機能は Smc1/3 ヘッドドメインのもつ ATP 加水分解活性に広く依存している。ATP の結合及び加水分解はヘッドドメインの会合と解離を誘導するが、近年の構造解析から、ヘッドドメインの構造変化が局所的なリングの開閉のみでなく、複合体全体の構造変化とカップリングしていることも示唆されており、この構造変化がコヒーシン分子機能に中心的に寄与していることが示されつつある。一方で、その寄与の分子機能メカニズムに関しては不明な点が多くあり、特に DNA ループ押出し活性に関しては、ATP 加水分解活性を必須とする一方、リングの開閉を必要としないなど、ヘッドドメイン構造変化の機能に関しては未解明な点が多い。

過去の当研究室の研究から、ヘッドドメインの強制的な会合が DNA 上のコヒーシンを過剰に安定化することが示されている。そこで本章では、コヒーシン-DNA 間相互作用の人為的な安定化がコヒーシン分子機能に与える影響を検証することで、ヘッドドメイン構造変化の DNA 結合安定性の制御機能に着目した解析を行った。

3.2 結果

3.2.1 コヒーシンの過剰な安定化は DNA ループ形成を阻害する

始めに、コヒーシンの DNA ループ形成活性を定量的に解析するため、一分子レベルでの DNA ループ観察系の確立を行った。まず、全反射蛍光顕微鏡下で DNA のガラス基板上への貼り付け、バッファー流路の変更、バッファーの交換を行うためのマイクロ流路を作製した。両端をビオチン化した 50 kbp 長の λ DNA を基質として用いるため、アビジンでコーティングしたカバーガラスを作製し、それを十字に切り抜いた両面テープによってスライドガラスに貼り付けることで、十字のマイクロ流路を作製した。マイクロ流路の四端にはバッファーの流入と排出を行うチューブを接続し、いずれかを封じることで縦経路と横経路の切り替えを可能とした (Fig.1-1 上)。作製したマイクロ流路に対し、始めに縦経路にビオチン化 DNA を添加しカバーガラス上に DNA を貼り付けた後 (Fig.1-1 (i))、経路を横方向に変更することで DNA を U 字型に伸展させた (Fig.1-1 (ii))。U 字型 DNA に対してコヒーシン、およびローディング因子である NIPBL-Mau2、ATP を添加することで DNA ループの形成を誘導した (Fig.1-1 (iii))。形成された DNA ループを全反射蛍光顕微鏡により観察、解析することでコヒーシンの DNA ループ形成活性を定量した。

コヒーシン-DNA 間相互作用安定性の変化と分子機能の関係を明らかにするため、始めに、この系を用いて、ヘッドドメインの構造変化に依る DNA 結合安定性の変化が DNA ループ形成活性に与える影響を検証した。序論で述べたように、ヘッドドメインは ATP 結合に依存して会合し、これがコヒーシンのトポロジカル結合活性に必要であること、ヘッドドメインの会合が NIPBL-Mau2 と共働して DNA と安定的に相互作用するグリッピング状態を誘導することが示されている (Çamdere *et al.*, 2018; Higashi *et al.*, 2020; Minamino *et al.*, 2018)。そこで、ヘッドドメインの会合によるコヒーシンと DNA の安定的な結合が DNA ループ形成活性に与える影響を検証するため、当研究室で作製されたヘッドドメイン会合型コヒーシンを用いて実験を行った。このヘッドドメイン会合型コヒーシンは Smc3 に FRB*タグ、Smc1 に FKBP タグが付加されており、ラパマイシンアナログ AP21963 (以下 AP と記載) の添加によってヘッドドメインを強制的に会合させることが可能である (Fig.1-1b)。過去の実験から、実際にこのヘッドドメインの強制的な会合によって DNA 上に結合したコヒーシンが安定化されることが DNA 上のコヒーシンの拡散運動の解析によって示されている (Sakata *et al.*, 2021)。このヘッドドメイン会合型コヒーシンを用いて、AP の存在下および非存在下で DNA ループ形成活性を比較したところ、興味深いことに、AP の添

加によって DNA ループ形成頻度は顕著に減少し、DNA の凝縮 (compaction) が増加した (Fig.1-1c,d)。さらに、AP 非存在下において、ATP の代わりに加水分解されずヘッドドメインを会合状態に維持する ATP アナログである ADP/AlFx を添加したところ、DNA ループ形成活性がほぼ完全に失われた (Fig.1-1d)。この結果から、ヘッドドメインの強制的な会合は DNA ループ形成を阻害し、ATP 加水分解によるヘッドドメインの解離が DNA ループ形成に必要であることが示された。一方で、形成された DNA ループの形状および形成速度を、DNA の輝度測定により算出したところ、AP の有無に関わらず DNA ループは U 字型 DNA の上下領域が対照的に押出される対称性ループであり、その形成速度にも差は見られなかった (Fig.1-1e,f)。以上の結果から、ヘッドドメインの強制的な会合が DNA ループを押出すステップよりむしろ DNA ループ形成の初期段階を阻害していることが示唆された。

3.2.2 ヘッドドメインの強制的な会合によりクロマチン上のコヒーシンは過剰に安定化される

一分子観察系による解析から、ヘッドドメインの強制的な会合が DNA ループ形成活性を阻害することが示された。次に、これがコヒーシンの細胞内機能に与える影響を検証した。細胞内でヘッドドメインの強制的な会合を AP 依存的に誘導するため、当研究室で作製されたヘッド会合型コヒーシン発現細胞を用いた解析を行った (Fig.1-2a)。前述したように、ヘッドドメインの強制的な会合によって、DNA 上のコヒーシンの安定化されることが *in vitro* の実験によって示されている (Sakata *et al.*, 2021)。そこで先ず、細胞内クロマチン上のコヒーシンの安定化がヘッドドメインの会合によって安定化されるかを光退色後蛍光回復 (FRAP) によって調べた。先行研究から、コヒーシンは G1 期と比較して、G2 期により安定化されることが示されていることから (Gerlich *et al.*, 2006)、コヒーシンのダイナミックな G1 期において AP 存在下、非存在下でコヒーシンの安定性を比較した (Fig.1-2a)。核の半分の領域に存在する Scc1-mClover の蛍光を退色させ、その蛍光の回復によりコヒーシンの安定性を測定したところ、AP の存在下では蛍光の回復が AP 非存在下と比較して遅れていた (Fig.1-2b,c)。ヘッドドメインの強制的な会合によるコヒーシンの安定化が、G2 期のコヒーシンの安定性に匹敵するかを調べるため、AP 非存在下で G2 期同調細胞を用いた FRAP 解析も行った (Fig.1-2b,c)。その結果先行研究と一致して、コヒーシンは G1 期よりも安定化されることが蛍光の回復の遅れにより示された (Fig.1-2e)。クロマチン上コヒーシンの安定性をより詳細に評価するため、蛍光の回復のプロットを双指数関

数的減衰曲線にフィッティングした (Fig.1-2d,e)。これにより、クロマチン上コヒーシンをより結合が安定な **stable** 集団とダイナミックな **dynamic** 集団に分類し、**stable** 集団の速度定数から安定的にクロマチンに結合したコヒーシンの結合維持時間 (**stable residence time**) を算出した (Fig.1-2f)。その結果、AP 存在下では AP 非存在下と比較して結合維持時間が顕著に増加し、興味深いことに、G2 期よりも長い維持時間を示した (Fig.1-2f)。一方で、蛍光退色時の退色していない核領域でのコヒーシンスIGNAL強度の落ち込みから、クロマチン上に結合しているコヒーシンの割合 (**bound fraction**) を算出したところ、これは AP の有無で差は見られず、G1 期においても G2 期と同等であった (Fig.1-2g)。以上の結果から、AP の添加によるヘッドドメインの強制的な会合が、G1 期において G2 期コヒーシンのようにその結合を安定化させることが示された。

3.2.3 ヘッドドメインの強制的な会合は染色体分配を阻害する

これまでの研究から、分裂期後期においては、コヒーシンは適切な染色体分配に必要であり、G1 期への移行と共にコヒーシスが姉妹染色分体間接着に働く接着型コヒーシンから、G1 期においてゲノム高次構造形成に働くループ形成型コヒーシンに置き換わるモデルが提唱されている。ヘッドドメインの強制的な会合がクロマチン上の DNA ループ形成活性を阻害したこと、G1 期におけるコヒーシンのダイナミクスを低下させたことを考慮すると、ヘッドドメインの解離によるコヒーシンの安定性の制御が、分裂期接着型コヒーシンから G1 期ループ形成型コヒーシンへの機能変換に重要である可能性が示唆される。過去の研究では分裂期においてもヘッドドメインの強制的な会合がコヒーシンを安定化させ、姉妹染色分体間接着を過剰にする表現型が観察されている (Sakata *et al.*, 2021)。そこで最後に、ヘッドドメインの会合によるコヒーシンの過剰な安定化が、接着の解消と分裂期から間期への移行に与える影響を生細胞観察により検証した。G2 期に同調した細胞に AP を添加し、2 時間の処理後、分裂期細胞をモニターした (Fig.1-3a,b)。その結果、AP の存在下では、分裂期後期に染色体が正しく分配されない染色体ブリッジの頻度が増加していた (Fig.1-3c,d)。また、分裂期の長さも AP の添加によって顕著に増加した (Fig.1-3e)。さらに、AP の添加によって、AP 非存在下では観察されなかった分裂期から G1 期への移行が観察されない細胞も確認された (Fig.1-3f)。以上の結果から、ヘッドドメインの強制的な会合によるコヒーシンの過剰な安定化が、分裂期染色体分配を阻害し、G1 期への移行を遅らせることが示された。

3.3 考察

3.3.1 DNA ループ形成活性におけるヘッドドメイン解離の必要性

本章の結果から、ヘッドドメインの強制的な会合による DNA 上コヒーシンの過剰な安定化が、DNA ループ形成を阻害することが示された (Fig.3-1d)。過去の生化学的解析から、ATP 結合状態のコヒーシンが DNA を強固にクランプする **gripping** 状態が存在することが明らかにされている (Higashi *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020)。このことと、ラパマイシンアナログによるヘッドの会合が DNA 上コヒーシンを過剰に安定化させることを考慮すると、ヘッドドメインの強制的な会合がコヒーシンを **gripping** 状態に維持し続けており、それが DNA ループ形成を阻害している可能性が考えられる。実際に DNA ループ形成は ATP 加水分解活性依存的であり (Davidson *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019)、本研究においても加水分解されない ATP アナログを用いた場合、DNA ループ形成は観察されなかった (Fig.3-1d)。このことから、コヒーシンと DNA の結合が安定化される **gripping** 状態が DNA ループ形成の前段階であるとすれば、ヘッドドメインの解離による **gripping** 状態からの遷移、それによる DNA-コヒーシン間相互作用安定化の変化が DNA ループ形成に必要であると考えられる。

一方で、ラパマイシンアナログの存在下でもコヒーシンはわずかに DNA ループを形成した (Fig.3-1d)。これは、ラパマイシンアナログによるヘッドドメインの会合が、ヘッド間の距離を完全にゼロにはしないためであると考えられる。実際に、分子動力的シミュレーションを用いた解析から、ラパマイシンアナログによる FKBP-FRB*間のテザリングを行っても、ヘッドドメイン間の距離は最大で 7~10 nm 開く余地があることが示されている (Sakata *et al.*, 2021)。おそらくこのわずかなヘッド間距離の自由度の増加によって **gripping** 状態の安定性が減少し、それが一過的な DNA ループ形成の許容につながったことが考えられる。

また、ヘッドドメイン会合条件で形成された DNA ループに関しては、その形状や形成速度に差はみられなかった (Fig.3-1e,f)。このことから、ヘッドドメインの解離によるコヒーシン-DNA 相互作用の変化を必要とするのは DNA ループ形成の初期段階であると推察できる。おそらく先に述べたヘッドドメインの解離による **gripping** 状態からの遷移が DNA ループを押出す初期反応に強く寄与しており、一度押出された DNA ループ構造の成長や形状維持には初期反応ほど大きなヘッドドメイン間の構造的自由度を必要としないことが考えられる。

さらに、ラパマイシンアナログ存在下では DNA の凝縮構造 (**compaction**) の形成頻度が顕著に増加した (Fig.3-1d)。この DNA 凝縮構造がラパマイシンアナログ非存在下でも形成されること、ADP/AlFx の存在下では形成されないことを

考慮すると、DNA ループ形成と DNA 凝縮構造形成はいずれも ATP 加水分解依存的な反応であるといえる。ヘッドドメインの会合によるコヒーシンの安定化が前者を減少させ、後者を増加させたことから、いずれの反応もコヒーシンによる DNA の **gripping** を起点としているものの、DNA ループ形成はヘッドドメインの解離に依存した、より動的な DNA-コヒーシン間相互作用に依存している可能性が考えられる。ラパマイシンアナログ存在下ではこの動的相互作用に必要な複合体の構造的自由度はわずかに増加することで DNA ループ形成が観察されるものの、DNA との安定的な結合が支配的となることでコヒーシンが DNA の静的クランプとして働き、結果的に DNA ループの形成より DNA 凝縮構造の形成が優先的に進行したことが考えられる。

まとめると、ATP 加水分解活性依存的なヘッドドメインの会合と解離は、コヒーシンの DNA 結合安定性を動的に制御することに重要であり、DNA ループ形成が、その動的な変化に強く依存した反応であることが示唆された。

3.3.2 細胞内におけるヘッドドメイン解離の必要性

細胞内 FRAP 実験から、ヘッドドメインの強制的な会合が G1 期細胞においてコヒーシンのクロマチン結合を安定化することが示された (Fig.3-2c-f)。興味深いことに、このとき安定化されたコヒーシンの結合安定性は G2 期のそれより増加していた (Fig.3-2f)。G2 期においては、コヒーシンは主として姉妹染色分体間接着に働いており、Smc3 のアセチル化や Sororin の結合によって G1 期よりも安定化される (Gerlich *et al.*, 2006)。ヘッドの会合がこの状態のコヒーシンよりも安定していること、Sororin の発現量や Smc3 アセチル化レベルが G1 期で大きく減少することを考慮すると (Minamino *et al.*, 2015; Nishiyama *et al.*, 2010; Rankin *et al.*, 2005)、ヘッドドメインの強制的な会合が、単にコヒーシンのクロマチン結合特性を G2 様にしただけでなく、**gripping** 状態のような、より安定的な状態に維持し続けることで、DNA との相互作用を過剰に安定化していることが考えられる。

興味深いことに、ヘッド会合によるコヒーシンの過剰な安定化は、染色体の不分離を引き起こし、M 期から G1 期への移行を阻害した (Fig.3-3)。過去の研究から、クロマチン高次構造が G1 期で最も明確であり、G2 期において接着に働くコヒーシンがゲノム高次構造形成を阻害することが示されている (Bastié *et al.*, 2024; Nagano *et al.*, 2017)。また、G2 期における、WAPL の分解によるクロマチン上の DNA ループ押し出しコヒーシンの増加が、姉妹染色分体間の分離 (sister chromatid resolution) を促進することが示されており (Batty *et al.*, 2023)、DNA ル

ープ押出しが姉妹染色分体間の分離に寄与し得ることはポリマーシミュレーションからも示されていることから (Goloborodko *et al.*, 2016)、ヘッ드의会合によるコヒーシンの過剰な安定化と DNA ループ押出し活性の阻害が染色体の分離を阻害し、その結果として M 期からの脱出が不安定になると考えられる。

これらのことから、ヘッドドメインの解離によるコヒーシン-DNA 相互作用安定性の低下が、先に述べたように **gripping** 状態といった安定状態からの DNA ループ押出し活性を促進し、細胞内においてゲノム高次構造形成に働くコヒーシンを増加させていると考えられる。後の章にて詳細に述べるが、おそらく接着に必須な Sororin や DNA ループ押出しに必須な NIPBL のようなコヒーシン制御因子は、複合体と結合することでヘッドドメインの局所的な構造的自由度を変化させ、それに伴って DNA 結合安定性が動的に制御されることで、細胞内における接着型コヒーシンと DNA ループ形成型コヒーシンの棲み分けが起こっているのではないかと推察できる。

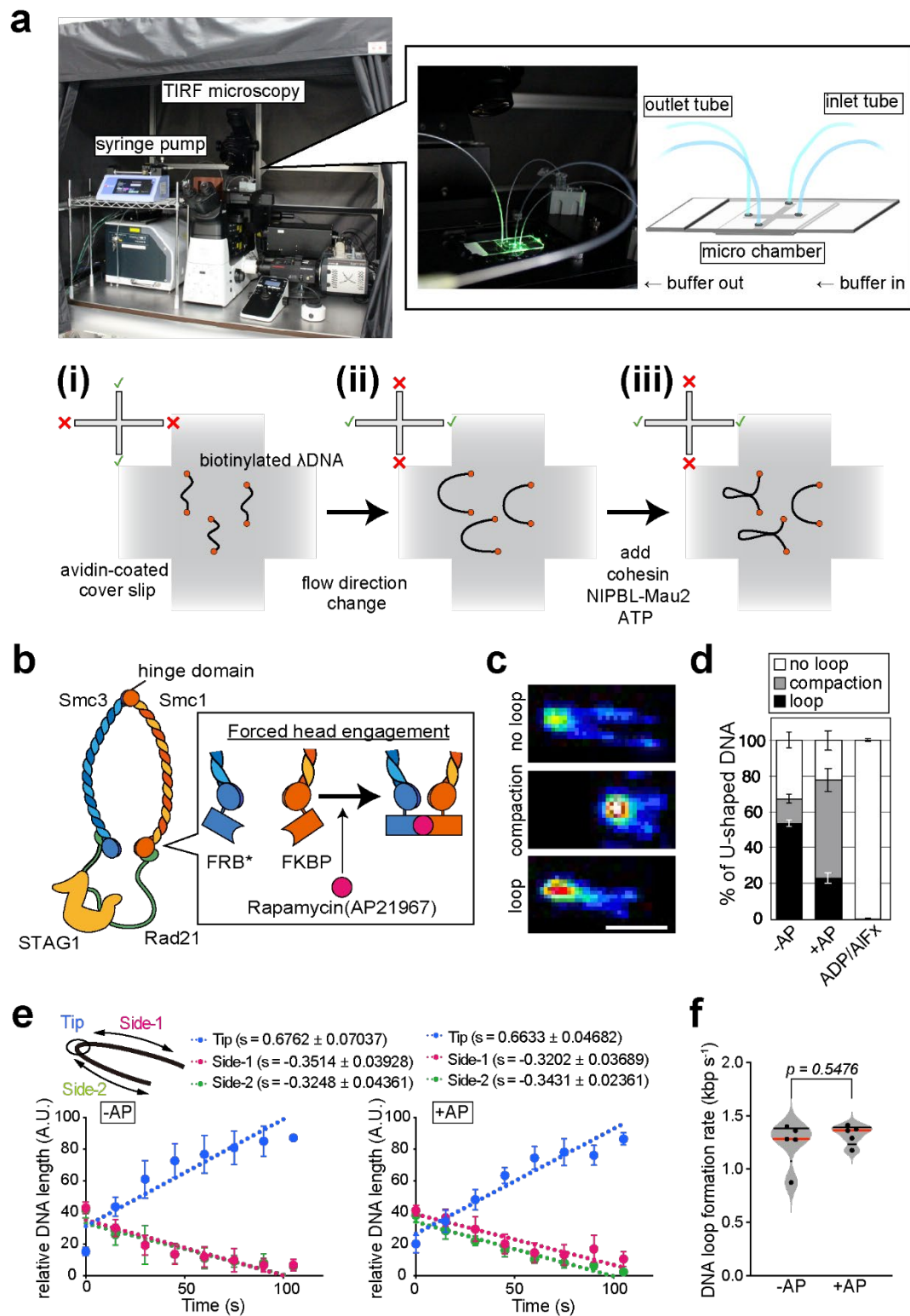


Fig.3-1 コヒーシンの過剰な安定化は DNA ループ形成を阻害する

- a. 全反射蛍光顕微鏡を用いた DNA ループ形成の一分子観察系。十字のマイクロ流路に対して Buffer を流入・排出させる inlet・outlet tube を接続し、全反射蛍光顕微鏡 (TIRF microscopy) 上で流路内 DNA の観察を行った。始めに縦経路にビオチン化 DNA を流し、アビジンコートされたカバーガラス上に貼り付けた (i)。その後、横経路の流れにより DNA を U 字型に伸展させ (ii)、コヒーシン、NIPBL-Mau2、ATP を添加することで DNA ループ形成を誘導した (iii)。
- b. コヒーシンの構造とヘッドドメイン会合型コヒーシン。Smc3 に融合された FRB*、Smc1 に融合された FKBP 間がラパマイシンアナログの添加によって会合し、ヘッドドメイン間が強制的にテザリングされる。
- c. 一分子観察系によって観察される DNA の構造変化。何も起こっていない状態 (上; no loop)、DNA 凝縮状態 (中央; compaction)、DNA ループ形成状態 (下; loop) を示している。DNA は SYTOX Orange により可視化した。スケールバーは 2 μm 。
- d. 全 U 字型 DNA の内、DNA ループを形成した割合を各条件で定量し比較した。実験は -AP/+AP 条件で 5 回ずつ行い、ADP/AIFx 条件で 3 回行った。DNA は -AP 条件で 471 個、+AP 条件で 550 個、ADP/AIFx 条件で 529 個解析した。図には平均値および標準偏差が示されている。
- e. DNA ループの対称性解析。ラパマイシンアナログの存在下または非存在下で形成された DNA ループの Side-1、Side-2、および Tip 領域における SYTOX orange シグナル強度を定量し、その値から算出した相対的な DNA 長を時間経過に沿ってプロットし、線形回帰を示した。S は傾きを表す ($n=5$)。Side-1 と Side-2 の相対長が同時に減少したことから、ループ形成が対称的であることが示される。
- f. DNA ループの形成速度。各条件で 5 個の DNA ループを解析した。赤いバーと黒いバーはそれぞれ中央値および四分位範囲を示す。P 値は Mann-Whitney の U 検定によって算出した。

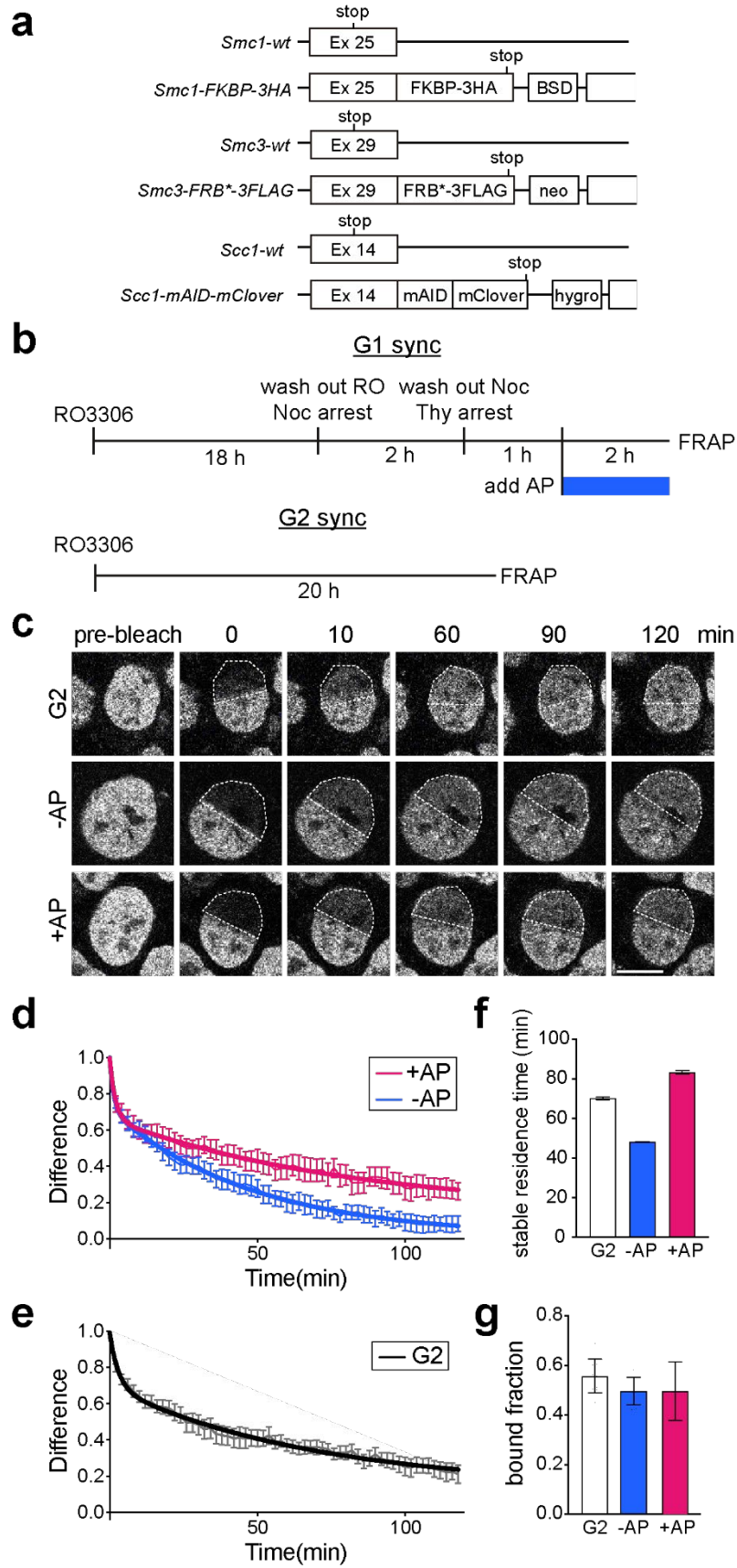


Fig.3-2 ヘッドドメインの強制的な会合によりクロマチン上のコヒーシンは過剰に安定化される

- a. 本研究で用いたヘッド会合型コヒーシン発現細胞。CRISPR-Cas9 法により Smc3 に FRB*が、Smc1 に FKBP が融合されている。さらに、Scc1 遺伝子には mClover タグが付加されており、コヒーシンの蛍光観察が可能である。
- b. 細胞周期の同調と FRAP 実験のスキーム。G2 期への同調は、Cdk インヒビター RO3306 を培地に添加し 18 時間細胞を培養することにより行った。G1 期への同調では、RO リリース後にノコダゾール (Noc) により M 期中期に同調させ、リリースの 3 時間後に観察を行った。
- c. G2 期 (上)、AP 非存在下 (中央)、AP 存在下 (下)における FRAP 前後の細胞。核の半分の領域の蛍光をブリーチングし、その回復を 10 分毎にモニタリングした。スケールバーは 10 μm 。
- d, e. 退色後最初のフレームでの退色領域/非退色領域の蛍光の差を 1 とし、蛍光回復量を双指数関数曲線に近似した。各条件で 10 個の細胞を解析し、平均値と標準誤差が示されている。
- f. それぞれの条件により得られた双指数関数から、安定的に結合したコヒーシンの結合維持時間を算出した。図には平均値と標準誤差が示されている。
- g. 各条件におけるクロマチン結合分画の定量解析。各条件で 10 個の細胞を解析した。

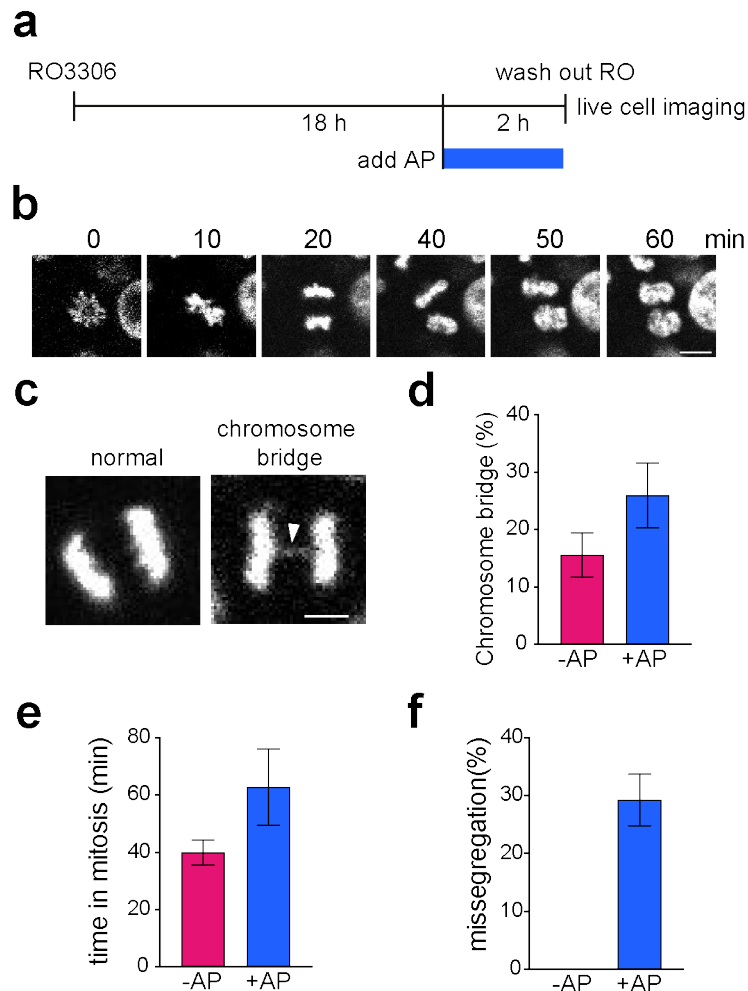


Fig.3-3 ヘッドドメインの強制的な会合は適切な染色体分配を阻害する

- 分裂期への同調とライブセルイメージングのスキーム。
- ライブセルイメージングにより観察された分裂期染色体。スケールバーは 10 μm 。
- ライブセルイメージングにより観察された正常に分裂した染色体 (左) と染色体ブリッジ (右)。スケールバーは 10 μm 。
- ラパマイシンアナログの存在下/非存在下で観察された染色体ブリッジの割合。実験は 3 回行い、各実験あたり 50 細胞以上を解析した。図には平均値と標準誤差が示されている。
- それぞれの条件において、核分裂に失敗した細胞の割合。実験は 3 回行い、各実験あたり 50 細胞以上を解析した。図には平均値と標準誤差を示す。
- 各条件における分裂期の継続時間。分裂期の時間は、核膜崩壊 (NEBD) から終期までの時間として定義し定量した。実験は 3 回行い、各実験あたり 50 細胞以上を解析した。図には平均値と標準誤差が示されている。

第4章 AT-hook による DNA 結合安定性の制御とゲノム高次構造形成の解析

4.1 緒言

第3章の結果から、ヘッドドメインの強制的な会合によるコヒーシンの過剰な安定化が、コヒーシン分子機能を阻害することが明らかになった。この結果から、コヒーシン-DNA 間相互作用の適切な制御がコヒーシン分子機能に重要であることが示唆された。次に、コヒーシン-DNA 間相互作用にその DNA 結合能をもって直接的に寄与することが考えられる STAG タンパク質に着目した解析を行った。特に、脊椎動物は体細胞において STAG1 と STAG2 の2種類の STAG パラログを発現しており、各々が異なるタイプのコヒーシン複合体 (STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシン) を形成することでゲノム高次構造形成に別々に寄与している (序論参照)。その一方で、STAG パラログのコヒーシン分子機能における差違は十分に検討されていない。そこで、本章では、STAG1、STAG2 の機能的差違を検討することで、STAG タンパク質のコヒーシン分子機能における寄与を、DNA ループ形成活性および細胞内におけるゲノム高次構造形成機能を中心に解析した。

4.2 結果

4.2.1 STAG1 は STAG2 よりも高い DNA ループ形成活性を持つ

コヒーシン分子機能における STAG タンパク質の重要性および STAG1、STAG2 の機能的差違を直接的に評価するため、まず、STAG タンパク質を含まないコヒーシン三量体 (trimer)、STAG1 または STAG2 を含むコヒーシン 4 量体 (STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシン) およびコヒーシンローディング因子 NIPBL-Mau2 を、昆虫細胞を用いて精製し(Fig.4-1a-c)、全反射蛍光顕微鏡を用いた一分子観察系によって DNA ループ形成活性を評価した。過去の報告 (Davidson *et al.*, 2019) と一致して、コヒーシン三量体では DNA ループの形成が観察されなかったことから、DNA ループ形成における STAG タンパク質の必要性が確認された (Fig. 4-1e)。興味深いことに、STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシンはどちらも DNA ループを形成したが、STAG1 コヒーシンは STAG2 コヒーシンと比較して顕著に形成効率が低いことが示された (Fig. 4-1d,e)。一方で、DNA ループの形成速度や形成された DNA ループの安定性には差は見られなかった (Fig.4-1f,g)。また、形成された DNA ループの対称性を計測したところ、DNA ループ形状に関しても、STAG1 コヒーシンと STAG2 コヒーシンで差は見られなかった (Fig.4-2a)

コヒーシンによる DNA ループ押出しは Smc1/3 のヘッドドメインが持つ ATP 加水分解活性に依存する (Davidson *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2019)。そこで、STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシンによる DNA ループ形成効率の差が、ATP 加水分解活性の違いを原因とするかを調べたところ、両者の ATP 加水分解活性に有意な差は見られなかった (Fig.4-1h,4-2a)。また、先行研究と一致して STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシンのいずれにおいても DNA、NIPBL-Mau2 に依存して ATP 加水分解活性効率が顕著に上昇した (Fig.4-2b,c)。これらの結果から、STAG1 コヒーシンは、STAG2 コヒーシンと比較して高い DNA ループ押出し活性を有している一方で、コヒーシンによる ATP 加水分解活性は両者で差がないことがわかった、また、STAG1 は DNA ループ形成の初期段階でその形成効率の増加に働くが、DNA ループ形成速度や安定化には寄与しないことが示された。

4.2.2 AT-hook はコヒーシンによる効率的な DNA ループ形成に必要である

STAG1 コヒーシンと STAG2 コヒーシンの DNA ループ形成活性の差の要因を特定するため、STAG1 と STAG2 の配列相同性に着目した。先述したように STAG1 と STAG2 は中央の HEAT リピート領域は高い相同性を示す一方で、天然変性領域 (IDR) から成る末端領域の相同性は低い (Fig.4-3a)。また、STAG1 の N 末端 IDR には DNA 結合部位である AT-hook モチーフが存在し、STAG2 はこれを持たない。AT-hook は DNA のマイナーグループに結合する DNA 結合モチーフであり、STAG1 モノマーの DNA 結合や DNA 上での拡散を制御することが示されている (Bisht *et al.*, 2013; Huth *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2016)。そこで、この AT-hook が STAG1 の高い DNA ループ形成活性に与える影響を検証するため、AT-hook 内のアルギニン残基をアラニンに置換させた STAG1 (STAG1-RA)、および N 末端領域に AT-hook を挿入した STAG2 (STAG2-AT) を作製し、DNA ループ押出し活性を評価した (Fig.4-3b,c)。その結果、STAG1-RA では DNA ループ形成効率が STAG1-WT と比較して顕著に減少した (Fig.4-3d)。その一方で、STAG2-AT では DNA ループ形成効率の増加が観察された (Fig.4-3d)。また、これまでの結果と一貫して、AT-hook の変異は DNA ループの形成速度および DNA ループの安定性には影響しなかった (Fig.4-3e,f)。また、これらの変異体においてもコヒーシンの ATP 加水分解活性、およびその NIPBL-Mau2、DNA への依存性に変化はなかった (Fig.4-3g, 4-4)。これらの結果から、STAG1 コヒーシンによる効率的な DNA ループの形成が AT-hook モチーフに依存していることが示された。

4.2.3 STAG1 は STAG2 よりも安定的に DNA と相互作用する

これまでの結果から、STAG1 と STAG2 が同等の ATP 加水分解活性を有する一方で、STAG1 が AT-hook モチーフ依存的により高い DNA ループ形成能を持つことが明らかになった。AT-hook モチーフは DNA のマイナーグループに結合する DNA 結合配列であり、先行研究から AT-hook の変異が STAG1 モノマーの DNA との相互作用を阻害することが示されている (Huth *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2016)。そこで、パラログ間の DNA ループ形成能の違いが、AT-hook モチーフの有無によるコヒーシン-DNA 間相互作用の差違にあると仮定し、STAG1-WT、STAG2-WT、STAG1-RA、STAG2-AT を有するコヒーシン複合体の DNA 結合を DNA ループ観察時と同様の系を用いて一分子レベルで検証した。Scc1 に付加した Halo タグを蛍光標識することでコヒーシンを可視化し、全 DNA 当たりのコヒーシンの平均分子数、及び結合の維持時間を異なる塩濃度条件下で比較した

(Fig.4-5a)。全 DNA 当たりのコヒーシンの平均分子数は、全 DNA 中、コヒーシンが結合した DNA の割合と、それらの DNA 上のコヒーシンの平均分子数の積として算出した。コヒーシンが結合した DNA の割合は、アッセイ間の誤差を小さくするため、最初のコヒーシン結合後、2 min 後にコヒーシンが結合している DNA の割合を測定した。また、コヒーシン一分子に相当する輝度は、ガラス基板上に非特異的に結合させたコヒーシンをブリーチングし、その輝度変化のステップサイズから算出した (Fig.4-5b)。その結果、STAG1-WT は STAG2-WT と比較して、DNA ループの形成観察条件である 50 mM NaCl の観察バッファ中ではコヒーシンの結合に差は見られなかった一方で、STAG2-WT コヒーシンは STAG1-WT コヒーシンよりも塩濃度上昇と共に DNA 結合を顕著に減少させた (Fig.4-5c)。また、コヒーシンの DNA 結合維持時間を比較したところ、いずれのコヒーシン複合体においても、塩濃度上昇と共に結合維持時間を減少させた一方で、STAG2-WT は STAG1-WT よりもその減少が顕著であり、100 mM NaCl 条件下では STAG1-WT と比較して有意に結合の維持時間を減少させた (Fig.4-5d)。これらの結果から、細胞内クロマチン画分上での STAG1/2 の塩感受性を比較した報告と一致して (Kojic *et al.*, 2018)、DNA との結合とその安定性において、STAG1 は STAG2 よりも高い塩耐性を持つことが示された。

興味深いことに、STAG1AT-hook モチーフの変異、および AT-hook モチーフの STAG2 への挿入は 50 mM NaCl 条件下では結合した DNA の割合を変化させなかった一方で、STAG1-RA は STAG2-WT と同様に、STAG1-WT と比較して塩濃度上昇による DNA への結合の減少が顕著だった (Fig.4-5c)。その一方、STAG2-AT は STAG2-WT と比較して DNA の結合割合を STAG1-WT と同等まで増加させた (Fig.4-5c)。この結果と一貫して、DNA 上でのコヒーシンの塩耐性は AT-hook モチーフの変異により顕著に減少し、AT-hook モチーフの挿入によって回復した (Fig.4-5d)。以上の結果から、コヒーシンと DNA の相互作用は、低塩濃度条件下においては STAG タンパク質の性質に依らない一方で、STAG2-コヒーシンは STAG1-コヒーシンと比較して初期結合および結合の維持における塩感受性が高いことが明らかになった。また、STAG1 のもつ DNA 結合の塩耐性が AT-hook モチーフに依存していることから、AT-hook 依存的な DNA ループの形成が STAG1 特有の DNA 結合安定性に由来するものである可能性が示唆された。

4.2.3 AT-hook はコヒーシンの安定的な DNA 結合に必要である

これまでの結果から、STAG1 コヒーシンは AT-hook モチーフ依存的な DNA 結合の安定性を介して DNA ループ押出しを促進することが示唆された。この可能性をより詳細に解析するため、DNA 上に結合したコヒーシンの安定性を、コヒーシンの拡散運動を解析することによって検証した。ガラス基板上にビオチン化 DNA を線状に貼り付け、NIPBL-Mau2 および ATP の存在下でコヒーシンを結合させた。高塩濃度バッファーによる非特異的結合および緩く結合したコヒーシンの洗浄ののち、蛍光標識されたコヒーシンの一分子トラッキングによって、DNA 上での拡散運動を観察した (Fig.4-6a,b)。コヒーシンの DNA 結合能に依存する拡散運動を解析するため、観察は高塩濃度条件下 (500 mM NaCl) で行った。実際に、ATP 存在下、非存在下のいずれにおいても STAG1 コヒーシン、STAG2-コヒーシンはどちらも自由拡散運動を示した (Fig.2-6b-d $MSD(t) \propto t^\alpha$; STAG1+ATP: $\alpha = 0.8257$, STAG2+ATP: $\alpha = 0.8738$, STAG1-ATP: $\alpha = 0.9128$, STAG2-ATP: $\alpha = 0.8816$)。コヒーシンのダイナミクスを定量的に理解するため、トラッキングしたコヒーシンの平均二乗変位 (MSD) から拡散係数 (D) を算出したところ、興味深いことに ATP の有無に関わらず、STAG1 は STAG2 と比較してより低い拡散係数、即ちより高い安定性を示した (Fig.4-6c,d)。さらに、これまでの結果と一貫して、AT-hook モチーフの変異により STAG1-コヒーシンの DNA 上での安定性は減少し、STAG2 への AT-hook モチーフの挿入により安定性は増加した (Fig.4-6e-f)。このことから、AT-hook モチーフは STAG1 に特有のコヒーシン-DNA 間相互作用の塩濃度耐性を付与するだけでなく、DNA 上での STAG1-コヒーシンの安定化にも寄与することが示された。

4.2.4 AT-hook は G1 期における安定的なクロマチン結合に必要である

これまでの結果から、STAG1 が AT-hook モチーフ依存的に DNA と安定的に結合し、DNA ループ押出し活性を促進することが示された。次に、AT-hook によるコヒーシンの安定化が、細胞内でのコヒーシンの挙動にどのように影響するかを調べるため、ヒト細胞を用いた解析を行った。まず、内在性の STAG1 に FKBP12^{F36V} タグを、STAG2 に mAID タグを CRISPR-Cas9 法により付加し、それぞれ dTAG 分解システムおよび 5-ph-IAA の添加による AID2 システムにより独立して分解が可能な細胞系列を作製した (Nabet *et al.*, 2018; Yesbolatova *et al.*, 2020) (Fig.4-7a,b)。同時に、STAG1 には mCherry2 タグを、STAG2 には mClover タグを付加し、蛍光観察を可能とした。これにより、内在性の STAG1 および

STAG2 が dTAG、5-ph-IAA の添加によりそれぞれ 1%以下、5%以下のレベルまで分解されることをウェスタンブロッティング、および蛍光観察により確認した (Fig.4-7c-e)。さらに、この細胞株に対して、ドキシサイクリンの添加により外来的に Halo タグを付加した野生型 STAG1 (STAG1-WT-Halo) もしくは AT-hook 変異体 (STAG1-RA-Halo) を発現する細胞株を作製した (Fig.4-8a)。

これらの細胞株を用いて、始めにコヒーシンのクロマチン結合に AT-hook 変異が与える影響を調べた。まず、ドキシサイクリンの添加による野生型 STAG1-WT と STAG1-RA の発現量を調べるため、ウェスタンブロッティングおよび Janeria Flour 646 (JF646) を用いた Halo タグ蛍光標識による外来性 STAG1 の蛍光観察を行ったところ、野生型 STAG1 は 50%以上の細胞で十分に発現が確認された一方で、STAG1-RA は細胞集団の 80%以上で発現が確認できなかった (Fig.4-8b-d)。そこで、G1 期、G2 期に細胞周期を同調させた細胞を、セルソーターを用いて発現レベルを揃えた上でクロマチン画分のウェスタンブロッティングを行った (Fig.4-8c-f)。d TAG および 5-ph-IAA の添加により内在性の STAG1 および STAG2 を分解したところ、Smc1 シグナルがクロマチン画分で検出されなくなったことから、コヒーシンの効率的な除去が確認された (Fig.4-8g)。一方、ドキシサイクリン存在下では、G1 期、G2 期の両方で、STAG1-WT、STAG1-RA いずれの発現もクロマチン上のコヒーシンレベルを同等に回復させた (Fig.4-8g)。この結果から、AT-hook はクロマチン上に結合するコヒーシンの総量には影響を与えないことが示された。

次に、クロマチンに結合したコヒーシンのダイナミクスのパラログ間差違および AT-hook の寄与を調べるため、光退色後蛍光回復 (FRAP) 法による解析を行った。始めに、ドキシサイクリン非存在下で STAG1、STAG2 それぞれのクロマチン結合安定性を、G1 期、G2 期に同調した細胞で計測した (Fig.4-9a,b)。第一章で行った実験と同様に、核の半分の領域の STAG1 シグナルもしくは STAG2 シグナルを退色させ、蛍光の回復から STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシンのクロマチン結合安定性を評価した (Fig.4-9c,d)。先行研究と一致して、コヒーシンの安定性は、穏やかな蛍光の回復に示されるように、G1 期より G2 期で高かった (Fig.4-9e,f)。さらに、STAG1、STAG2 それぞれで得られた蛍光の回復曲線を指数関数的減衰にフィッティングすることで、安定的にクロマチンに結合している集団と、ダイナミックに結合・解離を繰り返す集団のそれぞれについて、各集団の割合と結合の維持時間を算出した。蛍光退色時のシグナルの落ち込みから算出されるクロマチン結合量は STAG1 と STAG2 で大きな差がない一方で (Fig.2-9g)、STAG1 は STAG2 と比較して、G1 期、G2 期いずれにおいても安定的な集団の割合が高く、それぞれの集団のクロマチン上での結合維持時間 (dynamic residence time および stable residence time) も大きかった (Fig.4-9h)。こ

これらの結果から、過去の HeLa 細胞およびマウス胚性繊維芽細胞を用いた報告 (Cuadrado *et al.*, 2022; Wutz *et al.*, 2020)、および *in vitro* で得られた結果と一致して、STAG1 は細胞周期を通して STAG2 より高いクロマチン結合安定性を示すことが分かった。

続いて、ドキシサイクリンの添加により STAG1-WT-Halo もしくは STAG1-RA-Halo の発現を誘導した細胞を用いた解析を行った。ドキシサイクリン存在下で G1 期、G2 期へ細胞周期を同調させると同時に、dTAG の添加による内在性 STAG1 の分解および JF646 による STAG1-WT-Halo、STAG1-RA-Halo の標識を行い、FRAP を行ったところ、興味深いことに、G1 期において、STAG1-RA は STAG1-WT と比較して速い蛍光の回復、すなわち低いクロマチン結合安定性を示した (Fig.4-10a-c)。先に示した結果と一致して、クロマチン上に結合したコヒーシンの割合 (bound fraction) は STAG1-WT、STAG1-RA 間で差がなかった一方、STAG1-RA ではダイナミックな結合集団の割合が高く、安定的な結合の維持時間 (stable residence time) も短かった (Fig. 4-10g-j)。一方で、G2 期において STAG1-RA は野生型 STAG1 と同等の蛍光の回復を示し、ダイナミックなクロマチン結合コヒーシン、安定的なコヒーシンの割合およびそれらの結合維持時間のいずれのパラメータも両者で同等であった (Fig.4-10d-j)。

G1 期と異なり、複製後、G2 期のクロマチン上のコヒーシンは主として 2 本の姉妹染色分体間接着を維持する接着型コヒーシンとしてクロマチン上に存在しており、S 期、G2 期特異的なコヒーシン制御因子 Sororin によって安定化されることが知られている (Nishiyama *et al.*, 2010)。このことから、G2 期には AT-hook モチーフの有無に関わらず Sororin によってコヒーシンが安定化されている可能性が考えられた。この可能性を検証するため、STAG1-WT 発現細胞および STAG1-RA 発現細胞において、RNAi による Sororin ノックダウンを行い、コヒーシンのクロマチン結合安定性を検証した。Sororin ノックダウンにより、STAG1-WT 発現細胞、STAG1-RA 発現細胞のいずれにおいても M 期の姉妹染色分体間接着が 90%以上確立されなくなったことから、Sororin が効率的に除去されていることが確認された (Fig.4-11a-c)。まず、Sororin RNAi 存在下での内在性の STAG1 および STAG2 のクロマチン結合安定性を検証したところ、STAG1、STAG2 のいずれもクロマチン結合安定性の減少が、蛍光の回復曲線および結合維持時間により観察されたことから、STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシンいずれも G2 期では Sororin 依存的に安定化されていることが示された (Fig.4-11d-h)。

次に、STAG1-RA の G2 期における安定化が Sororin 依存的であるかを検証するため、Sororin RNAi 存在下で、ドキシサイクリンによる外来性 STAG1-WT、STAG1-RA の発現誘導の後、そのクロマチン結合安定性を調べた (Fig.4-12a)。そ

の結果、STAG1-WT、STAG1-RA のいずれも Sororin ノックダウンによってクロマチン結合安定性を減少させた (Fig.4-12b-e)。一方で、Sororin の非存在下においても、STAG1-WT のクロマチン結合安定性は STAG1-RA のそれと同等であった (Fig.4-12d,e)。この結果から、G2 期においては Sororin の有無に関わらず、STAG1 コヒーシンの安定性への AT-hook モチーフの寄与は低いことが示唆された。以上の結果から、クロマチン上の STAG1 コヒーシンが G1 期特異的に AT-hook モチーフによって安定化されることが示された。

4.2.5 姉妹染色分体間接着は AT-hook に依存しない

G2 期における FRAP 解析から、複製後のコヒーシンが AT-hook モチーフの有無に関わらず Sororin によって安定化されることが示された。また、以前の結果から、*in vitro* で STAG1 コヒーシンと STAG2 コヒーシンのトポロジカル結合活性が同等であることが示されている (坂田修士論文)。これらの結果から、AT-hook モチーフは姉妹染色分体間接着には必要でない可能性が考えられた。この可能性を検証するため、まず、STAG1-RA コヒーシンのトポロジカル結合活性を試験管内再構成系によって検証した。STAG1-WT コヒーシン、STAG1-RA コヒーシンを NIPBL-Mau2、ATP の存在下で環状 DNA とインキュベートし、高塩濃度条件下でコヒーシンを免疫沈降することで、トポロジカルに結合した DNA を共沈降させた。これらの共沈降された DNA がコヒーシンとトポロジカルに結合していることを確かめるため、免疫沈降後の DNA を制限酵素により処理し

、上清画分 (Supernatant; S)、ビーズ結合画分 (on Beads; B) における DNA 量を定量した (Fig.4-13a)。その結果、STAG1-WT コヒーシン、STAG1-RA コヒーシンいずれにおいても線状化した DNA の 70%以上が上清画分で観察され、トポロジカルに結合していることが確認された (Fig. 4-13b)。さらに、トポロジカルに結合した DNA 量は STAG1-WT、STAG1-RA 間で差は見られなかった。以上の結果から、トポロジカル結合活性に AT-hook モチーフは必要でないことが示された。

次に細胞内姉妹染色分体間接着への AT-hook モチーフの必要性を検証するため、STAG1-WT、STAG1-RA 発現細胞を用いた分裂期染色体の観察を染色体スプレッド法により行った。まず、ドキシサイクリン非存在下で dTAG および 5-ph-IAA の添加により内在性の STAG1 および STAG2 を分解し、分裂期染色体をスライドガラス上に播種することで観察したところ、90%以上の細胞で姉妹染色分体間接着が部分的 (modest) もしくは完全 (severe) に失われた (Fig.4-13c-e)。次に、ドキシサイクリン存在下で同様の観察を行ったところ、STAG1-WT の発現

によって接着不全の回復が観察され、STAG1-RA の発現も野生型と同等レベルで接着不全を回復した。以上の結果から、AT-hook モチーフはトポロジカル結合活性に必要でなく、細胞内での姉妹染色分体間接着も AT-hook モチーフに依存しないことが示された。

4.2.6 AT-hook はクロマチン高次構造形成を促進する

これまでの結果から、AT-hook モチーフが G1 期特異的にクロマチン上のコヒーシオンを安定化させることが示された。クロマチン上でのコヒーシオンの結合安定性は、ゲノム高次構造形成に直接的に関わることが先行研究により示唆されている (Wutz *et al.*, 2020)。このことから、AT-hook モチーフの欠損によるコヒーシオンの不安定化が、DNA ループ構造や TAD といったゲノム高次構造形成を阻害する可能性が考えられる。AT-hook モチーフの変異による細胞内ゲノム高次構造への影響を検証するため、Micro-C 法によるゲノム高次構造解析を行った。架橋された G1 期細胞内クロマチンをマイクロコッカルヌクレアーゼで処理した後、近接領域をライゲーション、プルダウンののち、断片を次世代シーケンサーによりシーケンシングした。シーケンスされたリードをゲノム上にマッピングすることで、細胞内で近接している領域を可視化した (Fig.4-14a)。ゲノム上で高頻度に近接する領域ほどヒートマップ上に濃い色でマッピングされ、マップ上の点状の領域は特定の遺伝子座間がコンタクトする DNA ループ構造、広範に濃い色の領域は領域内で相互作用が頻繁に起こる TAD 領域を表す。この解析により (i) (iv) ドキシサイクリン非存在下、dTAG/5-ph-IAA 非存在下、即ち内在性の STAG1 および STAG2 のみが存在している状態、(ii) (v) ドキシサイクリン非存在下、dTAG/5-ph-IAA 存在下、即ち内在性の STAG1/2 が存在しない状態、および (iii) (vi) ドキシサイクリン、dTAG、5-ph-IAA 存在下、即ち外来性 STAG1-WT または STAG1-RA のみが存在している状態のそれぞれで細胞内ゲノム高次構造を比較した (Fig.4-14b,c)。内在性の STAG1 および STAG2 を分解しないコントロール条件下ではゲノム領域間での相互作用が観察され、DNA ループ構造や TAD が確認され (Fig.4-14c (i) (iv))。これらの高次構造が dTAG、5-ph-IAA 添加による内在性の STAG1、STAG2 の分解により消失したことから、先行研究と一致して (Rao *et al.*, 2017)、細胞内のクロマチン高次構造がコヒーシオン依存的に形成されていることが示された。これに対して、ドキシサイクリンの添加による STAG1-WT の発現は内在性の STAG1、STAG2 の存在下と同等にクロマチン高次構造の形成を回復させた (Fig.4-14c (iii))。興味深いことに、STAG1-RA の発現条件においてもクロマチン高次構造の形成が観察された一方で、DNA ループ構造

や TAD 構造は STAG1-WT 発現時のそれと比較してわずかに減少していた (Fig.4-14c (vi))。

これら高次構造の変化を定量的に理解するため、形成された DNA ループの数とサイズ毎の分布を解析したところ、STAG1-RA は STAG1-WT と比較して形成された DNA ループの数が少なく (Fig.4-14d ; STAG1-WT: $n = 4008$ vs STAG1-RA: $n = 2862$)、特に、コヒーシン依存的に形成される DNA ループサイズである 0.1-0.5 Mb のループが顕著に減少していた (Fig.4-14e)。さらに、形成された TAD 強度を解析したところ、STAG1-RA 発現細胞では STAG1-WT 発現細胞と比較して、サイズの小さい TAD (<150kb) よりもよりサイズの大きな TAD (0.8-1Mb) の強度が顕著に減少していた (Fig.4-14f)。これらの結果から、AT-hook モチーフが G1 期におけるクロマチン上のコヒーシンの安定化のみでなく、コヒーシン依存的なクロマチン高次構造形成にも重要であることが示された。

4.2.7 AT-hook は Smc3 のアセチル化と CTCF との相互作用を促進する

STAG1-RA 発現細胞を用いた解析から、AT-hook モチーフが G1 期特異的に STAG1 コヒーシンの安定化に働き、クロマチン高次構造形成に寄与することが示された。一方で、G2 期においては Sororin 非存在下で、AT-hook の変異はコヒーシンのクロマチン結合安定性を変化させなかった (Fig.4-12d-e)。この結果は、*in vitro* での実験で示された AT-hook モチーフそのものに依るコヒーシンの安定化が、細胞スケールで観察した際のクロマチン上のコヒーシン安定性には寄与していない可能性を示唆する。即ち、G1 期における AT-hook 依存的なコヒーシンの安定化は、AT-hook モチーフの DNA 結合能に依るものではなく、他のコヒーシン安定化因子に依存したものであることが示唆される。先行研究から、G1 期において、STAG1 は STAG2 と比較して CTCF と共局在しやすく、Smc3 のアセチル化も受けやすいことから、STAG2 よりもクロマチン上で安定化されることが示されている (Wutz *et al.*, 2020)。そこで、この STAG1 特有の Smc3 アセチル化および CTCF との共局在の増加に AT-hook モチーフが関与しているかを検証した。まず、ドキシサイクリン存在下で内在性の STAG1 および STAG2 を分解し、外来性 STAG1 の発現によるクロマチン上コヒーシンの Smc3 アセチル化レベルを G1 期、G2 期で比較した。その結果、G2 期では STAG1-WT および STAG1-RA 発現細胞で Smc3 アセチル化レベルに差は見られなかった一方で、G1 期においては STAG1-RA 発現細胞で野生型発現細胞と比較して顕著な減少が観察された (Fig.4-15a-c)。次に、CTCF との共局在に AT-hook モチーフの変異が与える影響を検証するため、外来性 STAG1 発現細胞の免疫沈降を行った。そ

の結果、STAG1-RA 発現細胞では、STAG1-WT 発現細胞と比較して Smc3 アセチル化レベルの減少が確認されただけでなく、CTCF とコヒーシンの相互作用が顕著に減少することが分かった (Fig.4-15d-e)。以上の結果から、AT-hook モチーフは G1 期細胞内において Smc3 アセチル化とコヒーシン-CTCF 間の相互作用を促進することが示された。

4.2.8 STAG1N 末端領域の KR パッチが DNA ループ形成を促進する

AT-hook モチーフは脊椎動物の STAG1 には広く保存されているが、単一の STAG タンパク質をもつ他の真核生物には存在しない。一方で、先行研究から AT-hook モチーフを持たない酵母のコヒーシンにおいても DNA ループの形成が報告されている (Guérin *et al.*, 2024; Higashi *et al.*, 2021)。そこで、AT-hook モチーフを持たない他の生物種においても、AT-hook の機能を代替し得る DNA 結合配列が存在するのではないかと考え、ヒト STAG タンパク質と出芽酵母、分裂酵母、線虫およびショウジョウバエの持つ STAG タンパク質 (Scc3、SA) の N 末端領域のアラインメントを行った (Fig.4-16a)。その結果、出芽酵母、分裂酵母、線虫の Scc3 およびショウジョウバエの SA においても N 末端領域にリジン、アルギニンのクラスター (KR-patch) が発見された (Fig.4-16a)。この KR パッチが AT-hook モチーフと同様の機能を持つか検証するため、AT-hook を変異させた STAG1 (STAG1-RA) に、出芽酵母 Scc3 の持つ KR パッチを挿入した変異体を作製した (Fig.4-16b)。この STAG1 タンパク質を含むコヒーシンを精製し、DNA ループ形成能を一分子観察系により解析した (Fig.4-16c)。その結果、KR パッチを挿入した STAG1-RA は、AT-hook モチーフ変異によって減少した DNA ループ形成能を顕著に回復させた (Fig.4-16d)。一方で、形成された DNA ループ形成の維持時間は、STAG1-WT と比較してわずかに増加したものの、大きく変化させなかった (Fig.4-16e)。総じて野生型 STAG2 に AT-hook モチーフを挿入した際と同様の結果が得られたことから、AT-hook モチーフ様のリジン・アルギニンクラスターが DNA ループの形成を促進することが示された。

4.3 考察

4.3.1 AT-hook による DNA 結合安定性の制御と DNA ループ形成メカニズム

本章の結果から、STAG1 コヒーシンの STAG2 よりも高い DNA 結合安定性と DNA ループ形成活性をもち、それが STAG1 特異的な AT-hook モチーフに依存していることが示された。DNA-コヒーシン間相互作用の一分子解析では、50 mM NaCl の条件下では AT-hook モチーフの有無に関わらずコヒーシンの DNA 結合や結合の維持時間に差は認められなかったものの、塩濃度の上昇と共に STAG2 および AT-hook 変異型 STAG1 では DNA 結合能を減少させた (Fig.4-5a-c)。過去の報告から、コヒーシン-DNA 間の相互作用には Smc1/3 ヘッドドメインおよびヒンジドメイン、ローディング因子 NIPBL のもつ正電荷アミノ酸パッチが寄与していることが示されている (Higashi *et al.*, 2020; Murayama & Uhlmann, 2015; Panarotto *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2020)。低塩濃度条件下においては、DNA との相互作用は AT-hook モチーフの有無に依らずこれらの電荷依存的な DNA 相互作用領域が十分に働くため、AT-hook の寄与は相対的に小さいことが考えられる。一方で、塩濃度の上昇に際しては、これらの電荷依存的な相互作用領域に AT-hook モチーフが追加の DNA 結合領域を提供することで、コヒーシンの安定化に寄与していることが推察できる。

興味深いことに、より高い塩濃度 (500 mM NaCl) においても、AT-hook は DNA 上のコヒーシンの拡散運動を阻害し DNA 上コヒーシンを安定化した (Fig.4-6)。この高塩濃度条件下では、DNA-コヒーシン間の静電相互作用はほぼ遮断され、コヒーシンと DNA がトポロジカルに結合した状態であると考えられる。この状態においても AT-hook がコヒーシン-DNA 間相互作用を安定化させたことから、AT-hook が単に電荷依存的に DNA とのコンタクトを促進するだけでなく、マイナーグループを介して DNA と強固に結合することで DNA をアンカリングする機能があることも推察される。すなわち、AT-hook はコヒーシン-DNA 間相互作用の塩耐性と局所的なコヒーシンの強固なアンカリングの両面で機能し、コヒーシンの安定性に寄与すると考えられる。

一方、DNA ループ形成反応は塩感受性が高く、50 mM NaCl を超える塩濃度条件下では形成効率が大きく減少する (Davidson *et al.*, 2019)。この低塩濃度条件下では AT-hook によるコヒーシンの DNA 結合能に差は見られなかったが、おそらく AT-hook は、複合体の他の領域が DNA と結合している状態で DNA との追加のコンタクトポイントを提供することで一過的にコヒーシンを安定化し、それが DNA ループ形成頻度の増加に寄与していると推察できる。これまでの研究から、STAG1、STAG2 に共通した DNA 結合パッチである、中央領域の Scc1 との

結合インターフェースや、Smc1/3 および NIPBL のもつ DNA 結合パッチが DNA ループ形成に必須であることが示されている (Bauer *et al.*, 2021; Panarotto *et al.*, 2022)。今回、STAG2 や STAG1RA を持つコヒーシンでも DNA ループがわずかながら形成されたこと、形成された DNA ループの形状や維持時間に差が見られなかったことから、AT-hook モチーフは DNA ループ形成反応それ自体には必要でなく、これまでに同定された、STAG1/2 に共通した DNA ループ形成必須領域による反応の促進因子として働く可能性が示唆される。また、AT-hook モチーフが STAG1N 末端の天然変性領域 (IDR) に存在する点も興味深い。IDR による柔軟性により AT-hook はコヒーシン全体の構造状態に依らず動的な DNA 結合を可能にするフレキシブルな相互作用面として働くことができる。

まとめると、AT-hook モチーフはコヒーシンの構造変化に依存しないフレキシブルな DNA との相互作用領域としてコヒーシンを DNA 上にアンカリングする“スタビライザー”であり、それによって複合体の他の必須領域による DNA ループ形成を促進する“エンハンサー”として働くことが考えられる。

4.3.2 AT-hook によるコヒーシンの安定化とゲノム高次構造形成の促進

(i) CTCF によるコヒーシン安定化メカニズム

細胞内における AT-hook モチーフの機能解析から、STAG1 コヒーシンが AT-hook 依存的にクロマチン上で安定化され、ゲノム高次構造形成に寄与することが示された。AT-hook の変異は G1 期特異的にコヒーシンのクロマチン結合安定性を減少させ、興味深いことに CTCF との相互作用および Smc3 アセチル化レベルも同時に減少させた (Fig.4-10, 4-15)。過去の研究から、STAG1 は STAG2 よりも CTCF との共局在頻度および Smc3 のアセチル化レベルが高いことが示されており、STAG1 の高いクロマチン結合安定性がこれらの因子に依存していることが示唆されていた (Cuadrado *et al.*, 2022; Wutz *et al.*, 2020)。一方で、CTCF の持つ YDF モチーフは STAG タンパク質と直接的に相互作用することが示されているものの、この結合サイトは STAG1 と STAG2 の間で高度に保存されている (Y. Li *et al.*, 2020)。このことから、AT-hook は CTCF との直接的な結合親和性を高めるといよりも、より間接的なメカニズムを介して CTCF との相互作用を促進している可能性が高い。

考えられるメカニズムとして、AT-hook による DNA ループ形成頻度の増加が、CTCF との共局在を促進しているというモデルを提案したい。これまでの研究から、一分子観察系で CTCF が実際にコヒーシンによる DNA ループ押出しを停止

させること (Davidson *et al.*, 2023)、さらにコヒーシンによる DNA ループ押出しと CTCF によるその停止、アンカリングがゲノム高次構造形成に十分なプロセスであることがポリマーシミュレーションから示されている (Fudenberg *et al.*, 2016; Hansen, 2020)。今回の結果から、AT-hook が DNA ループ形成を促進することを考慮すると、細胞内においても AT-hook 依存的に DNA ループ押出しに働くコヒーシンが増加することが考えられ得る。これらの DNA ループ押出しコヒーシンは、ゲノム上を移動する過程で CTCF とエンカウントすることで停止し、CTCF 結合サイトで安定化されることで DNA ループ構造の基部を形成する。この際、コヒーシンの安定化に最も効率的に働くのは、互いに向かい合って配置された **convergent** な CTCF 結合サイトであることが示されており、単にコヒーシンが CTCF と相互作用するだけでなく DNA ループを形成していることが安定化の前提となる (Nanni *et al.*, 2020; H. Zhang *et al.*, 2023)。つまり AT-hook 依存的な DNA ループ形成の促進は、クロマチン上で DNA ループを押出し、**convergent** な CTCF サイトによってコヒーシンが安定化される頻度を増加させることが可能であるといえる。逆に、AT-hook を持たず、DNA ループ形成頻度の低い STAG2 は **convergent** な CTCF との共局在頻度が減少し、結果としてクロマチン上で不安定になると解釈できる (Fig.4-17)。

また、AT-hook 変異による Smc3 アセチル化レベルの減少も、このモデルに基づいて説明することができる。過去の報告で、CTCF の分解がクロマチン上コヒーシンの Smc3 アセチル化レベルを減少させることが示されていることから (Wutz *et al.*, 2020)、AT-hook 依存的な CTCF 共局在頻度の増加が、Smc3 のアセチル化を促進している可能性が高い。一方で、本研究において AT-hook 変異によるアセチル化レベルの減少は、CTCF との共局在レベルの減少よりも顕著であった (Fig.4-15e)。このことは、Smc3 のアセチル化が単に CTCF との共局在のみで規定されているわけではなく、追加の促進メカニズムが存在していることを示唆している。例えば、AT-hook によるコヒーシンの安定化がアセチル化酵素である Escal のコヒーシンとの相互作用頻度を増加させている可能性や、AT-hook による DNA ループ形成の促進が脱アセチル化酵素である HDAC8 のコヒーシンへのアクセスを局所的に阻害している可能性が考えられる。

(ii) Smc3 アセチル化によるコヒーシン安定化メカニズム

Smc3 のアセチル化は DNA 複製期および G2 期には Sororin の結合に必要であるため、Sororin による Wapl の結合阻害と共働してコヒーシンのクロマチン結合安定化に働く (Nishiyama *et al.*, 2010)。一方で、G1 期においては Sororin の存在量は顕著に低いことから、G1 期での Smc3 のアセチル化はこのような Sororin 依

存的なコヒーシンの安定化に機能しないと考えられる (Rankin *et al.*, 2005)。よって、G1 期では先に述べたような CTCF との結合が Wapl によるコヒーシンのクロマチンからの解離に対する主たる拮抗作用であると考えられる。実際に、ChIP-seq ベースの結果では、クロマチン上のコヒーシンは大部分が CTCF と共局在位置に局在することが多くの研究で示されている (Hansen, 2020; Schmidt *et al.*, 2010; Wutz *et al.*, 2020)。

これまでの研究から、Smc3 のアセチル化が Pds5 との結合を促進し、ループの拡大を抑制することが示唆されている (Dauban *et al.*, 2020; van Ruiten *et al.*, 2022; Wutz *et al.*, 2017, 2020)。Pds5 は Wapl の足場となる HEAT リピータンパク質で (序論参照)、Esco1 による Smc3 アセチル化にも必要である (Minamino *et al.*, 2015)。また、NIPBL と競合的にコヒーシンと結合することで、コヒーシンの ATPase 活性を阻害し、DNA ループの拡大を抑制すると考えられている (Petela *et al.*, 2018; van Ruiten *et al.*, 2022; Wutz *et al.*, 2020)。一方、Pds5 は Wapl の足場ともなるため、単なる Smc3 アセチル化の増加は、コヒーシンの不安定化に直結する可能性が考えられる。つまりこの場合、Pds5 の結合と Wapl の阻害の両立がコヒーシンの安定化に必要となるので、この安定化メカニズムは CTCF による安定化と同時に起こると考えるのが妥当である。

一方で、Smc3 アセチル化依存的且つ CTCF 非依存的なコヒーシンの安定化メカニズムも考えられ得る。過去の研究から、Smc3 アセチル化それ自体が Wapl によるコヒーシンの解離作用を抑制することが示されている (Beckouët *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2012; Elbatsh *et al.*, 2016)。Wapl はコヒーシンの Smc3-Scc1 間の結合界面 (Kleisin N-gate) を解離させることでコヒーシンを DNA 上から外すが (Beckouët *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2012; Elbatsh *et al.*, 2016; Murayama & Uhlmann, 2015)、この N-gate の解離にヘッドドメインの会合が必要であることも示されている (Beckouët *et al.*, 2016; Elbatsh *et al.*, 2016; Muir *et al.*, 2020)。Smc3 のアセチル化はヘッドの会合状態を阻害すること (Chapard *et al.*, 2019)、及び会合に先立つヘッドの解離を阻害することが示されており (Murayama & Uhlmann, 2015)、いずれにしても Wapl の基質となり得るヘッド近傍の局所的な構造変化に作用することで Wapl を阻害する可能性が考えられる (Fig.4-18)。AT-hook による Smc3 アセチル化の促進が、CTCF 非依存的にこのような作用によってコヒーシンの不安定化を抑制している可能性も考えられる。

Smc3 のアセチル化のコヒーシン構造への影響はまだ十分に検証されていない。AT-hook は ATPase 活性に影響しないことから、AT-hook 自体がヘッド構造に影響を与える可能性は低い、Smc3 アセチル化によるヘッド構造の制御に対して作用する可能性はある (Fig.4-18)。Smc3 アセチル化がどのようにヘッド構造を変化させるのかに加え、STAG1 コヒーシン、STAG2 コヒーシンの Smc3 アセチ

ル化状態におけるコンフォメーションの違いを観察することができれば、より STAG1/2 コヒーシンのアセチル化レベルの差と、クロマチン結合安定性の差の分子メカニズムの解明に近づくことが期待できる。

(iii) G2 期における AT-hook の寄与

G1 期の AT-hook 依存的なコヒーシンの安定化と対照的に、G2 期においては、AT-hook の変異はコヒーシンの安定性を変化させなかった (Fig.4-10)。Sororin のノックダウンから、G2 期においては AT-hook の有無に関わらず Sororin によりコヒーシンが安定化されることで姉妹染色分体間接着が維持されることが示された (Fig.2-12, 2-13)。興味深いことに、Sororin 非存在下では STAG1-WT と STAG1-RA のクロマチン結合安定性は同程度であった。このことは、G2 期において、G1 期における AT-hook 依存的な DNA ループ押し出し効率の増加と、それに端を発するコヒーシンの安定化メカニズムの寄与が相対的に小さいことを示唆している。実際、G2 期では、CTCF のクロマチン結合量は G1 期と同等である一方で、TAD やクロマチンループは G1 期よりも減少し、CTCF とコヒーシンの共局在も減少することが示されている (Haarhuis *et al.*, 2017; Hansen *et al.*, 2017; Wutz *et al.*, 2017)。このことから、G2 期のコヒーシンは主として姉妹染色分体間接着に働いており、DNA ループ形成と接着機能がトレードオフの関係であるとすれば、G2 期には DNA ループ押し出しに働くコヒーシンが G1 期より少ないため、AT-hook による安定化プロセスの寄与が小さくなったと考えられる。

G2 期において、AT-hook の有無に関わらず Smc3 のアセチル化レベルが変化しなかったこともこの仮説と整合的である。S 期における Smc3 のアセチル化は Sororin の結合に必要であるため (Nishiyama *et al.*, 2010)、AT-hook の変異が Smc3 のアセチル化を阻害すれば、Sororin による安定化は起こらなくなる。したがって、G2 期には高いアセチル化レベルが維持されており、AT-hook の有無に関わらずコヒーシンが Sororin による安定化を受けることができることが示唆される。おそらくこれは、細胞周期を通して発現し、G1 期のアセチル化を担う Esc1 に加え、S 期特異的な Esc2 が相加的にコヒーシンをアセチル化したことに由来すると考えられる (Alomer *et al.*, 2017; Minamino *et al.*, 2015)。一方で、G2 期の Sororin 非存在下でも、STAG1 のクロマチン結合安定性は STAG2 より高かった。このことから、G2 期には STAG1 を選択的に安定化する、もしくは STAG2 を不安定化する追加のメカニズムが存在する可能性を示唆しており、その分子基盤のさらなる解明は今後の重要な課題である。

4.3.3 ゲノム高次構造形成メカニズムの進化的保存性

SMC タンパク質は多様な生物種で保存されており、真核生物においてコヒーシンは構造的にも高度に保存されている。酵母からヒトに至るまで、コヒーシンは ATP 加水分解活性をもつ Smc1/3 ヘッドドメインや DNA ループ形成に必須な STAG の持つ DNA 結合領域も保存されている。このことから、単一の STAG タンパク質 (Scc3/SA) のみを持つ酵母やショウジョウバエにおいても、基本的には共通した DNA ループ押出しメカニズムを備えている可能性は高い。興味深いことに、AT-hook 様のリジン、アルギニン (KR) クラスタは Scc3、SA にも保存されており、実際に本研究では、出芽酵母 Scc3 の KR クラスタが AT-hook 変異コヒーシンの DNA ループ形成能を回復することが示された (Fig.4-16)。これらの結果から、単一の STAG タンパク質しかもたない原始的な生物種のコヒーシンも、AT-hook に依存した DNA ループ形成促進機能を有しており、機能的には STAG1 と近い性質をもつことが示唆される。

細胞内においては、酵母 (Guérin *et al.*, 2024; Hsieh *et al.*, 2015; Mizuguchi *et al.*, 2014) やショウジョウバエ (Rowley *et al.*, 2017)、線虫 (Jordan Rowley *et al.*, 2020) においても TAD 様構造やループドメインといったゲノム高次構造が観察されている。一方で、同様に N 末端に KR クラスタを持つ減数分裂型 STAG タンパク質である STAG3 は、マウス生殖幹細胞において CTCF との共局在や高次構造形成が弱いことが報告されている (Nagano *et al.*, 2025)。また、酵母を用いた別の研究では、DNA ループ押出し活性を失った変異体においてもゲノム高次構造が形成され得ることが示されている (Guérin *et al.*, 2024)。さらに、STAG1 を分解した細胞においても STAG2 特異的なゲノム高次構造は形成されることから (Cuadrado, Giménez-Llorente, *et al.*, 2019; Kojic *et al.*, 2018; Wutz *et al.*, 2020)、ゲノム高次構造は常に AT-hook や KR クラスタによって促進される DNA ループ形成活性にのみ依存しているわけではなく、転写因子や他の安定化因子の介在など、複数の要素が組み合わさることで形成され则认为するのが妥当である。したがって、生物種、細胞種特異的にゲノム高次構造形成への DNA ループ押出し活性の寄与度は異なっており、その寄与は、細胞種や組織特異的な因子によって制御されている可能性が考えられる。実際、STAG2 は STAG1 よりも、細胞種、組織特異的な遺伝子の転写やスーパーエンハンサーの制御に強く関与することが示されている (Cuadrado, Giménez-Llorente, *et al.*, 2019; Kojic *et al.*, 2018; Viny *et al.*, 2019)。そうであれば、STAG2 のような DNA ループ形成活性の低いパラログの獲得は、より他の因子の影響を受けやすい特定の条件下でのみ働くようプログラミングされた結果であるとも解釈できる。STAG2 の変異頻度が高い白血病

細胞では造血幹細胞分化に必須な転写因子 RUNX1 と STAG2 が高度に共局在し、これらの変異が特定のゲノム高次構造を崩壊させることも示されている (Ochi *et al.*, 2020)。このような STAG2 と協働する転写因子が、STAG2 コヒーシンの DNA ループ形成活性をエンハンスする、もしくは DNA ループ形成活性非依存的に STAG2 と協働してゲノム高次構造を形成する可能性も考えられ得る。

これら知見を踏まえると、脊椎動物が KR クラスターに依存した“強い” DNA ループ押出し因子である STAG1 に加え、特定の文脈においてのみ機能する、“弱い” DNA ループ押出し因子である STAG2 を獲得したことによって、より高度に制御されたゲノム高次構造形成および遺伝子発現制御が可能にする進化的戦略を採った、というシナリオを考えることができる。

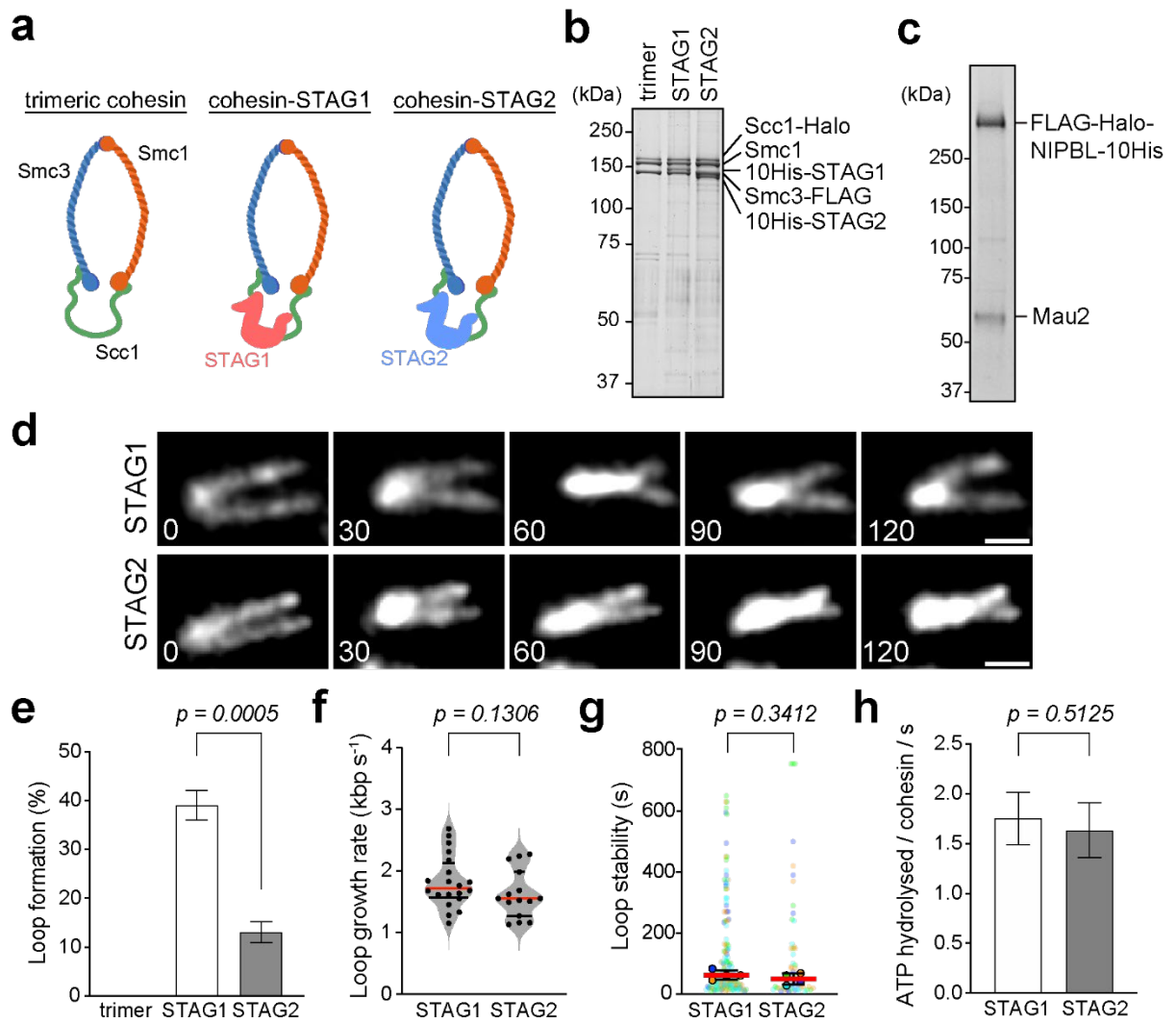


Fig.4-1 STAG1 は STAG2 よりも高い DNA ループ形成活性を持つ

a. コヒーシン複合体の模式図。

b, c. SDS-PAGE により分離したコヒーシントライマー、cohesin-STAG1、cohesin-STAG2 (b) および NIPBL-Mau2 複合体 (c) の SYPRO Ruby 染色像。

d. cohesin-STAG1 (上段) および cohesin-STAG2 (下段) によって形成された DNA ループ。DNA は SYTOX Orange により可視化した。スケールバーは 2 μm 。

e. U 字型 DNA 上での DNA ループ形成頻度。トライマーについては 3 回、テトラマーについては 4 回の独立した実験からデータを収集した。DNA はトライマーで 329 個、STAG1 で 372 個、STAG2 で 364 個解析した。図には平均値および標準偏差が示されている。P 値は Welch の t 検定により算出した。

- f.** cohesin-STAG1 または cohesin-STAG2 による DNA ループ成長速度。赤いバーおよび黒いバーはそれぞれ中央値および四分位範囲を示す DNA は STAG1 で 20 個、STAG2 で 15 個解析した。P 値は両側 Mann–Whitney の U 検定により算出した。
- g.** cohesin-STAG1 または cohesin-STAG2 存在下で形成された各 DNA ループの維持時間に基づいて評価した DNA ループの安定性。実線の点は各条件における中央値を示し、同じ実験に由来するデータ点は色分けして示した。赤いバーおよび黒いバーはそれぞれ各実験の中央値の平均および四分位範囲を示す。データは 4 回の独立した実験から収集した (STAG1: n = 28, 41, 52, 51 DNAs; STAG2: n = 14, 16, 17, 11 DNAs)。P 値は Mann–Whitney の U 検定により算出した。
- f.** NIPBL–Mau2 および DNA 存在下における cohesin-STAG1 および cohesin-STAG2 の ATP 加水分解速度。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値と標準偏差が示されている。P 値は Welch の t 検定により算出した。

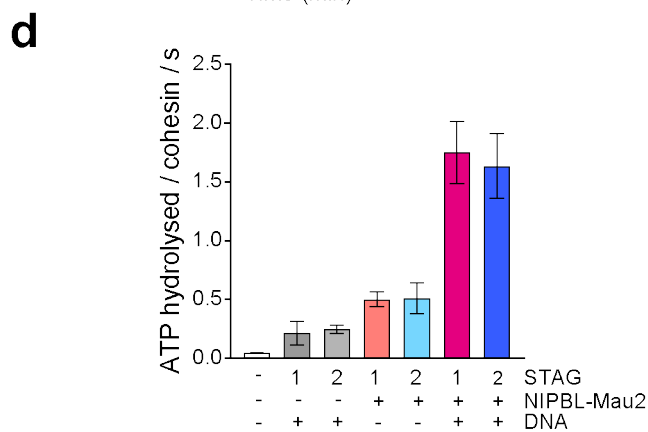
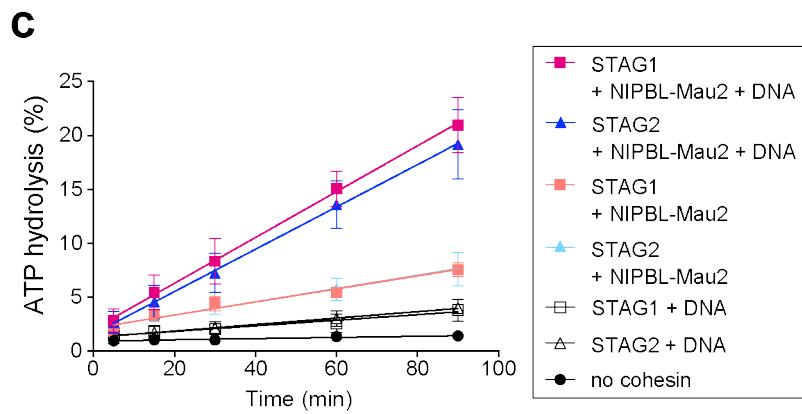
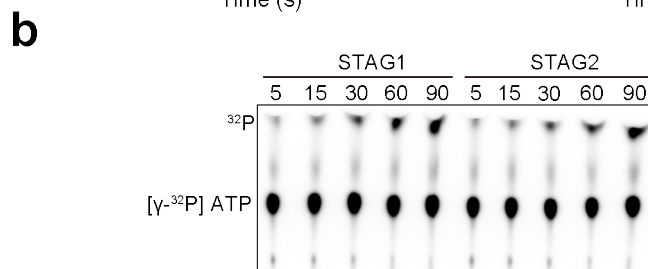
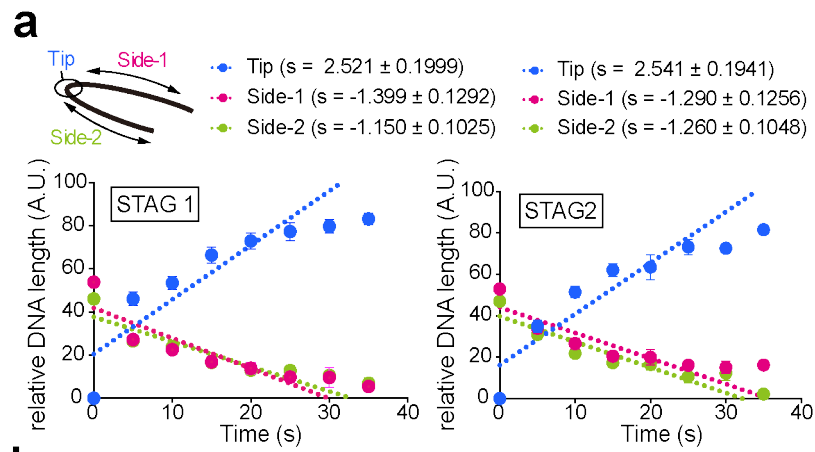


Fig.4-2 STAG1 コヒーシンと STAG2 コヒーシンは同等の ATP 加水分解活性を持つ

- a. DNA ループの対称性解析。STAG1 コヒーシンおよび STAG2 コヒーシンにより形成された DNA ループの Side-1、Side-2、および Tip 領域における SYTOX orange シグナル強度をそれぞれ 10 個定量し、その値から算出した相対的な DNA 長を時間経過に沿ってプロットし、線形回帰を示した。S は傾きを表す ($n=5$)。Side-1 と Side-2 の相対長が同時に減少したことから、ループ形成が対称的であることが示される。
- b. NIPBL-Mau2 および DNA 存在下における cohesin-STAG1 または cohesin-STAG2 の ATP 加水分解を評価するために、薄層クロマトグラフィー (TLC) とオートラジオグラフィーを用いた。反応は示した各時間点で停止させた。[γ - ^{32}P] ATP と加水分解産物である ^{32}P のシグナル強度を測定し、加水分解された ATP の割合を算出した。
- c. b に示した ^{32}P のシグナル強度に基づいて定量した ATP 加水分解量。値は、各条件下で加水分解された ATP の割合を示す。データは 3 回の独立した実験から得られた。図には平均値と標準偏差が示されている。
- d. に示したデータに線形近似を行い、その傾きから算出した、各条件下における ATP 加水分解速度。データは 3 回の独立した実験から得られた。図には平均値と標準偏差が示されている。

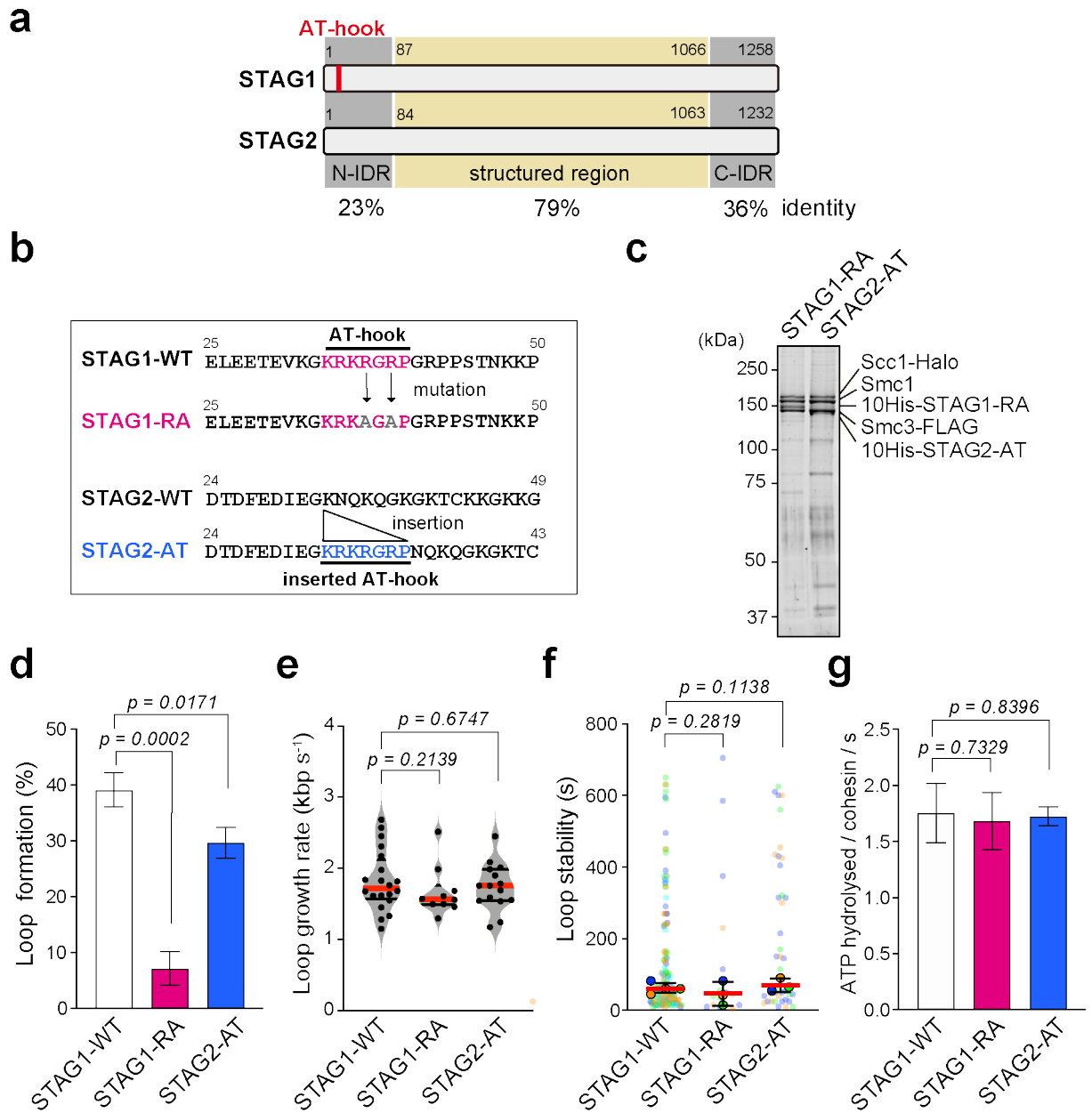


Fig.4-3 AT-hook はコヒーシンによる効率的な DNA ループ形成に必要である

a. ヒト STAG1 と STAG2 の配列相同性の模式的比較。

b. AT-hook 変異型 STAG1 (STAG1-RA) および AT-hook 挿入型 STAG2 (STAG2-AT) の模式図。STAG1-RA では、AT-hook モチーフ中の 2 残基のアルギニンをアラニンに置換した。STAG2-AT では、AT-hook 配列 (KRKRGRP) を STAG2 の対応する N 末端領域に挿入した。

- c. SDS-PAGE で分離した後の cohesin-STAG1-RA および cohesin-STAG2-AT の SYPRO Ruby 染色像。
- d. U 字型 DNA 上での DNA ループ形成頻度。比較のために用いた STAG1-WT のデータは Fig.2-1e と同一である。それぞれの条件で 3 回の独立した実験からデータを収集した。DNA は STAG1-RA で 226 個、STAG2-AT で 165 個解析した。図には平均値および標準偏差が示されている。P 値は Welch の t 検定により算出した。
- e. cohesin-STAG1-RA または cohesin-STAG2-AT による DNA ループ成長速度。比較のために用いた STAG1-WT のデータは Fig.2-1f と同一である。赤いバーおよび黒いバーはそれぞれ中央値および四分位範囲を示す DNA はそれぞれ 15 個解析した。P 値は Mann-Whitney の U 検定により算出した。
- f. cohesin-STAG1-RA または cohesin-STAG2-AT 存在下で形成された各 DNA ループの維持時間に基づいて評価した DNA ループの安定性。比較のために用いた STAG1-WT のデータは Fig.2-1e と同一である。実線の点は各条件における中央値を示し、同じ実験に由来するデータ点は色分けして示した。赤いバーおよび黒いバーはそれぞれ各実験の中央値の平均および四分位範囲を示す。データは 3 回の独立した実験から収集した (STAG1-RA: n = 8, 4, 4 DNAs; STAG2-AT: n = 20, 14, 10 DNAs)。P 値は Mann-Whitney の U 検定により算出した。
- g. NIPBL-Mau2 および DNA 存在下における cohesin-STAG1-RA および cohesin-STAG2-AT の ATP 加水分解速度。比較のために用いた STAG1-WT のデータは Fig.2-f と同一である。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値と標準偏差が示されている。P 値は Welch の t 検定により算出した。

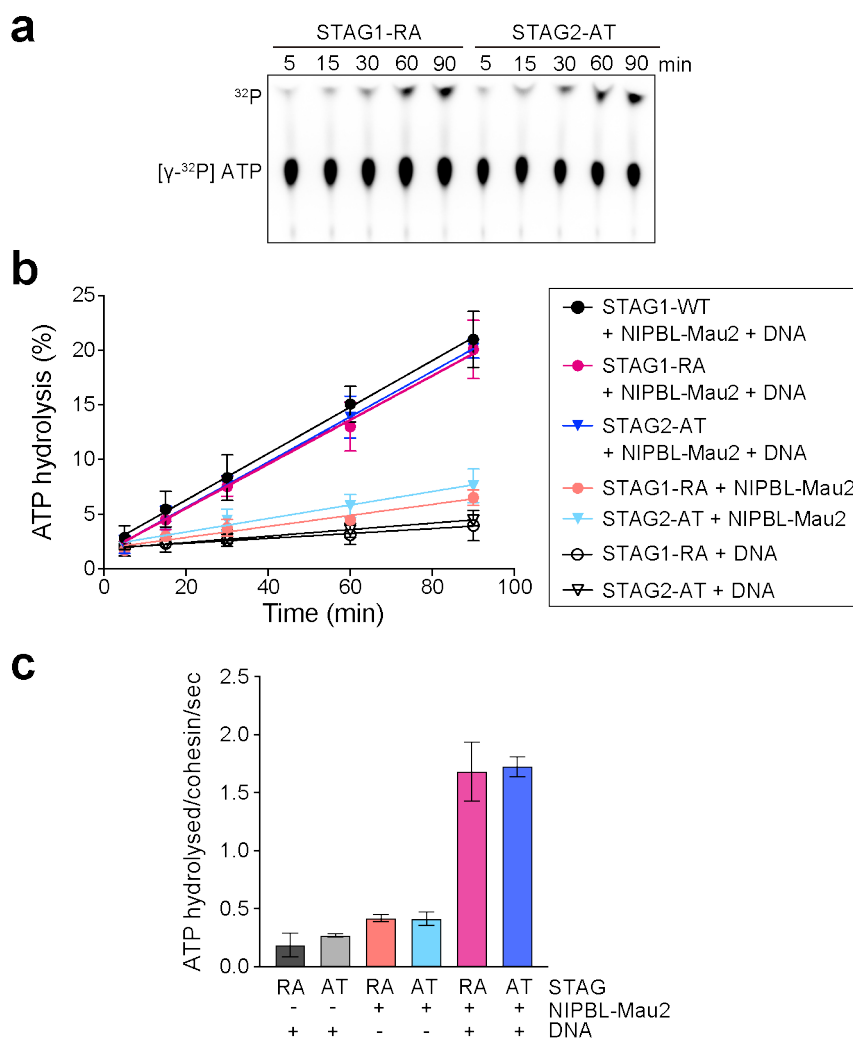


Fig.4-4 コヒーシンの ATP 加水分解活性は AT-hook に依存しない

- a.** NIPBL-Mau2 および DNA 存在下における cohesin-STAG1 または cohesin-STAG2 の ATP 加水分解を評価するために、薄層クロマトグラフィー (TLC) とオートラジオグラフィーを用いた。反応は示した各時間点で停止させた。[γ-³²P] ATP と加水分解産物である ³²P のシグナル強度を測定し、加水分解された ATP の割合を算出した。
- b.** **a** に示した ³²P のシグナル強度に基づいて定量した ATP 加水分解量。値は、各条件下で加水分解された ATP の割合を示す。データは 3 回の独立した実験から得られた。図には平均値と標準偏差が示されている。
- c.** に示したデータに線形近似を行い、その傾きから算出した、各条件下における ATP 加水分解速度。データは 3 回の独立した実験から得られた。図には平均値と標準偏差が示されている。

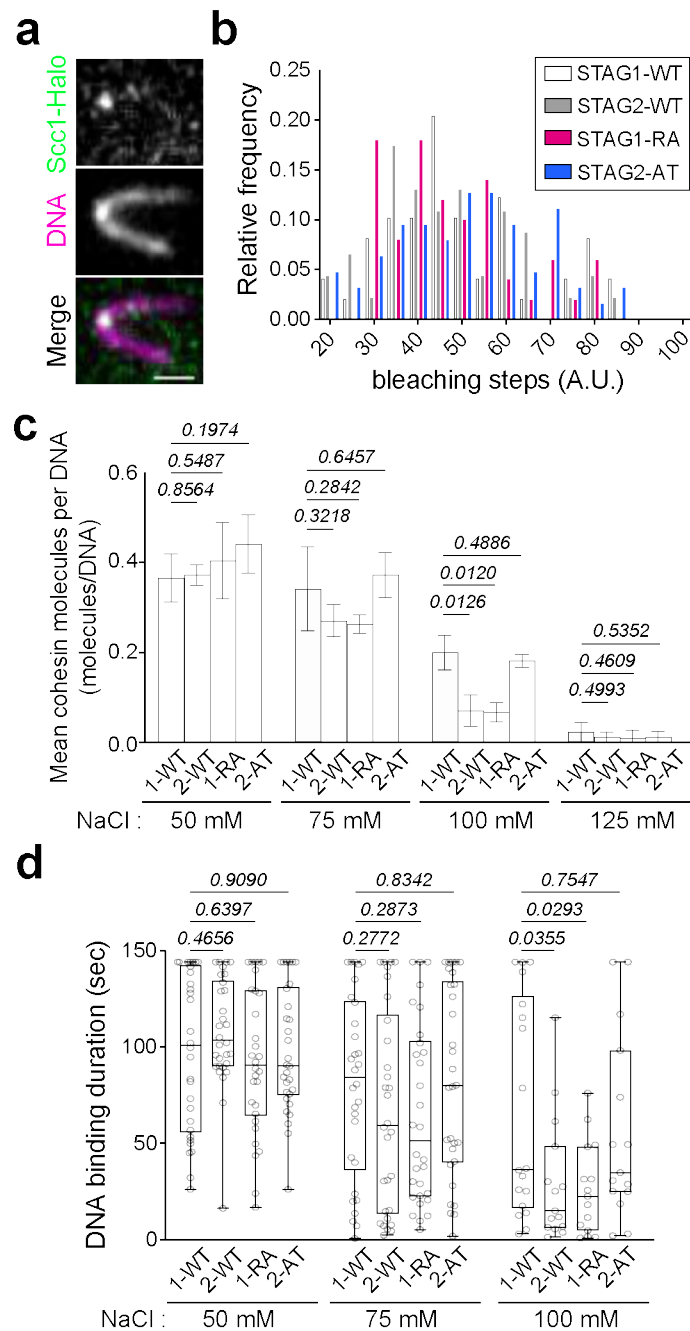


Fig.4-5 AT-hook はコヒーシンの DNA 結合を促進する

- a.** U 字型 λ -DNA に結合した Halo-Alexa 488 標識コヒーシン。DNA は SYTOX Orange により可視化した。スケールバーは 2 μ m。
- b.** ガラス表面に非特異的に結合したコヒーシンのブリーチングステップサイズの分布。各条件につき 45 個以上のコヒーシンシグナルからデータを収集した。

- c. 異なる塩濃度条件における全 DNA あたりのコヒーシンの平均分子数。コヒーシンの初回結合イベントから 2 分後における、コヒーシンが結合している DNA 分子の割合と DNA 上のコヒーシンの平均分子数の積として算出した。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値と標準偏差が示されている。P 値は Welch の t 検定により算出した。
- d. DNA 上の Halo-Alexa 488 標識コヒーシンの結合維持時間。50 mM, 75 mM NaCl 条件下では 30 個の、100 mM NaCl 条件下では 15 個の DNA 結合コヒーシンデータを収集した。図には中央値と四分位範囲、データの範囲が示されている。P 値は両側 Mann–Whitney の U 検定により算出した。

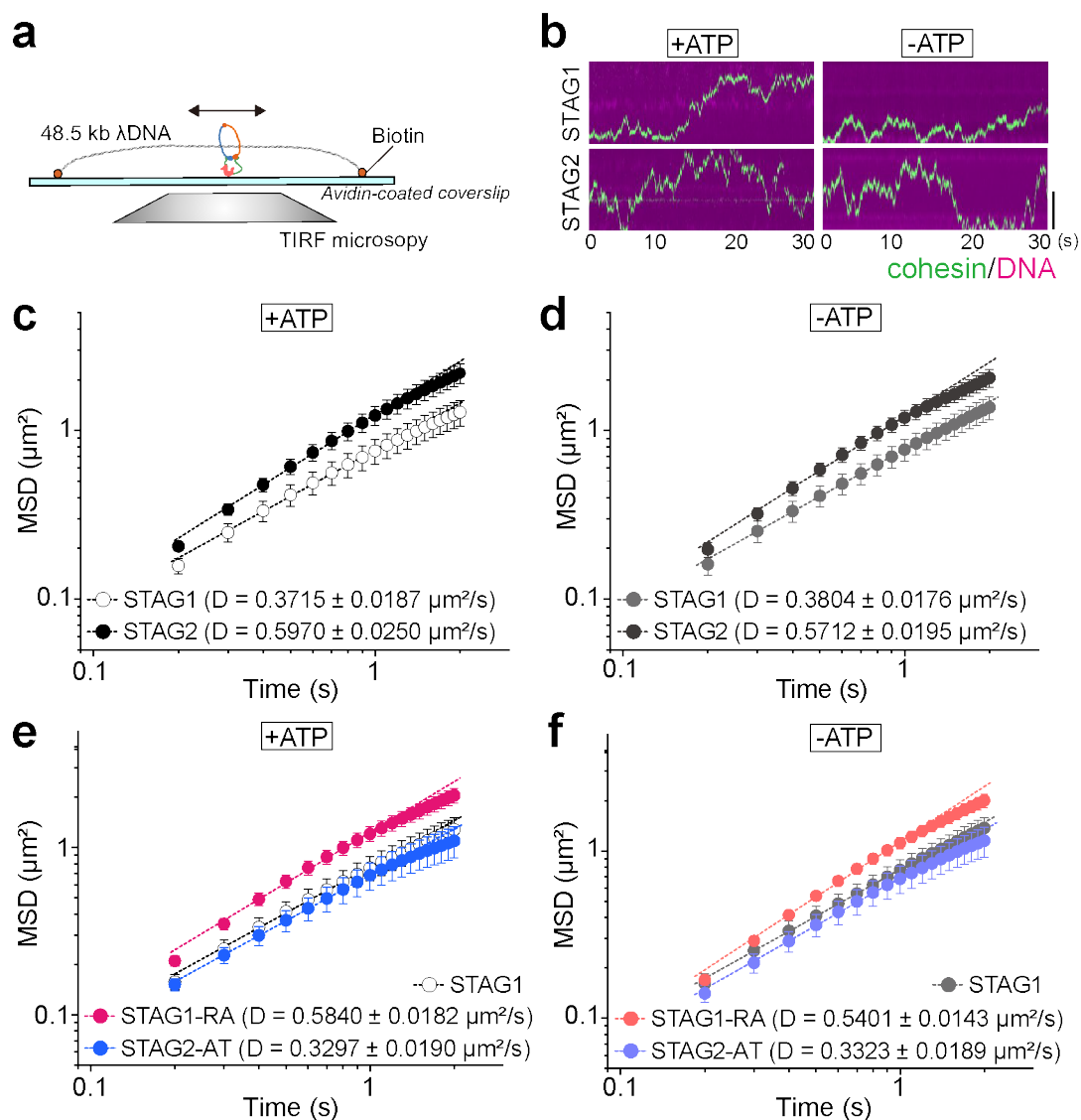


Fig.4-6 AT-hook はコヒーシンの安定的な DNA 結合に必要である

- a.** コヒーシンのトランスロケーションアッセイの模式図。ビオチン標識した λ DNA 分子をアビジンコートしたカバーガラス上に直線状に固定した。NIPBL-Mau2 および ATP 存在下でコヒーシンを DNA 上にロードした後、高塩洗浄により非結合または緩く結合したタンパク質を除去した。DNA 結合コヒーシン粒子は 0.1 秒間隔で 30 秒間追跡した。
- b.** Alexa488 標識 cohesin-STAG1 (上段) および cohesin-STAG2 (下段) の ATP 存在下/非存在下でのカイモグラフ。DNA は SYTOX Orange で標識した。スケールバーは 2 μm 。

- c, d.** DNA 結合 cohesin-STAG1 および cohesin-STAG2 について、拡散係数 D を算出するために求めた平均二乗変位 (MSD) と時間の ATP 存在下 (c)、ATP 非存在下 (d)における log-log プロット。各条件につき 25 個のコヒーシン粒子から D 値を算出した。図には平均値と標準誤差を示している。
- e, f.** DNA 結合 cohesin-STAG1-RA および cohesin-STAG2-AT について、拡散係数 D を算出するために求めた平均二乗変位 (MSD) と時間の ATP 存在下 (e)、ATP 非存在下 (f) における log-log プロット。各条件につき 25 個のコヒーシン粒子から D 値を算出した。図には平均値と標準誤差を示している。

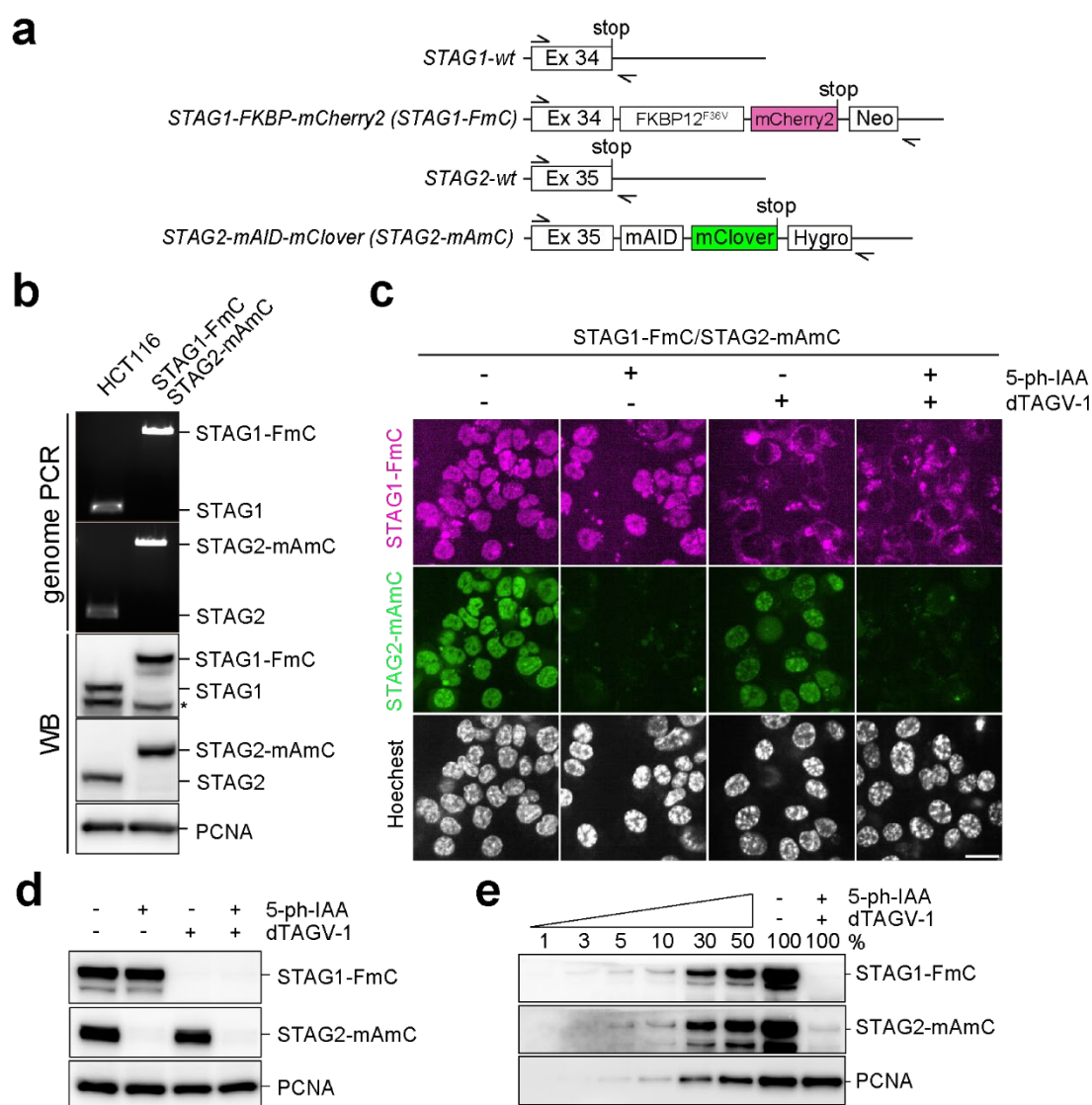


Fig.4-7 STAG1/2 ダブルデグロン細胞の樹立

- a.** ヒトゲノム上の STAG1 アレルに導入した FKBP12F36V-mCherry (STAG1-FmC) および STAG2 アレルに導入した mAID-mClover (STAG2-mAmC) の模式図。矢印は PCR プライマー位置を示す。
- b.** a に示したプライマーペアを用いた PCR 解析および、親株 HCT116 細胞と STAG1-FmC/STAG2-mAmC 細胞のウェスタンブロット解析。アスタリスクは非特異的シグナルを示す。
- c.** STAG1/2 ダブルデグロン細胞のライブセルイメージング。撮影の 4 時間前から 5-phenyl-indole-3-acetic acid (5-ph-IAA)、dTAGV-1、あるいはその両方で処理したダブルデグロン細胞を観察した。DNA は Hoechst 33342 で染色した。スケールバーは 20 μm 。

- d. dTAGV-1 および 5-ph-IAA を単独または同時に添加した際の、STAG1 および STAG2 のパラログ特異的な分解を評価したウェスタンプロット解析。
- e. ウェスタンプロットの定量解析より、dTAGV-1 および 5-ph-IAA 処理後には、STAG1 および STAG2 のタンパク質量が、それぞれ非処理時の 3%および 5%未満にまで減少していることが示された。

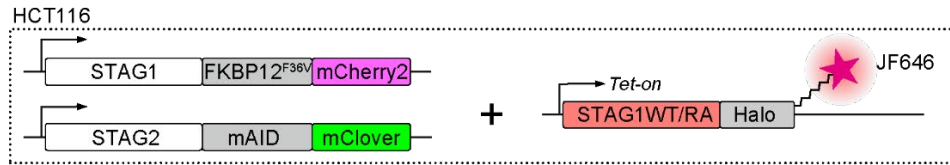
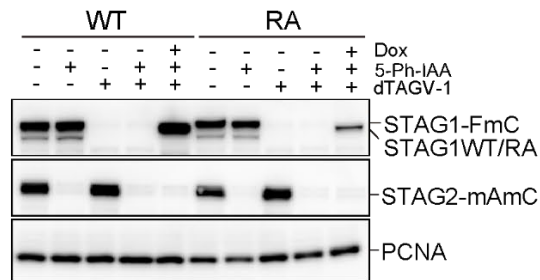
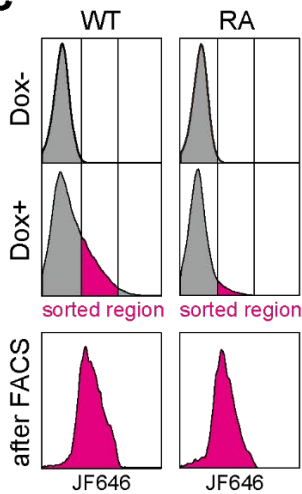
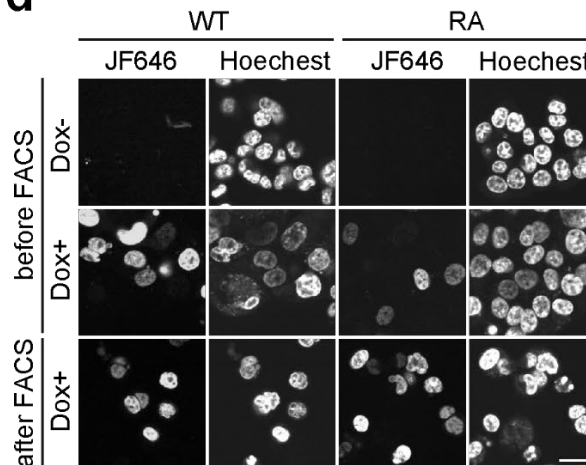
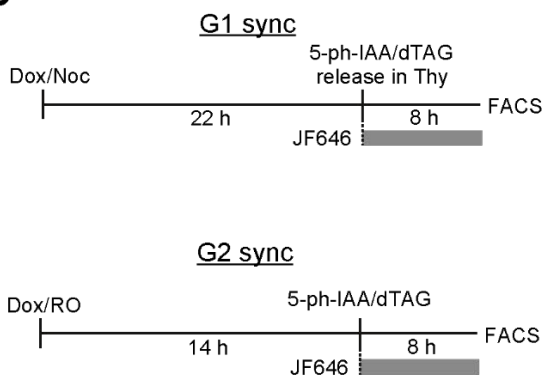
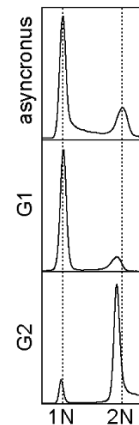
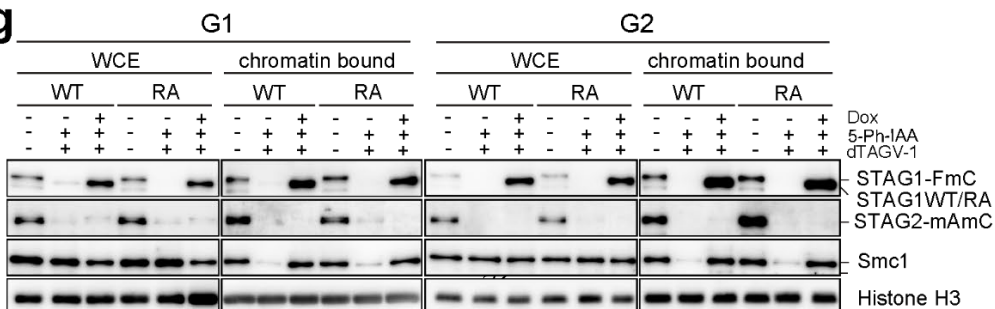
a**b****c****d****e****f****g**

Fig.4-8 STAG1-WT/RA 発現細胞の樹立

- a. STAG1-WT/RA 発現細胞の模式図。STAG1/2 ダブルデグロン細胞に対して、Tet-on 発現システムを用いて外来性 STAG1-WT/RA-Halo を発現させた。
- b. ソーティング前に、示した条件で処理した STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo 発現細胞のウェスタンブロット解析。
- c. ドキシサイクリン (Dox) 存在下または非存在下で培養した STAG1-WT-Halo および STAG1-RA-Halo 発現細胞における JF646 蛍光のフローサイトメトリープロファイル。マゼンタで示した領域はセルソーティングに用いたゲートを示す。下段は、ソーティング後の集団における JF646 蛍光プロファイルを示す。
- d. ソーティング前の STAG1WT-Halo および STAG1RA-Halo 発現細胞と、ソーティング後の細胞のライブセルイメージング画像。DNA は Hoechst 33342 で染色した。スケールバーは 20 μm 。
- e. G1 期（上段）および G2 期（下段）への細胞周期同調の概要図。
- f. DAPI で染色した非同調、G1 同調、および G2 同調細胞のフローサイトメトリーで測定した DNA プロファイル。
- g. G1 または G2 に同調し、示した条件で処理した STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo 発現細胞を FACS でソーティングし、全細胞抽出物（WCE）およびクロマチン結合画分について行ったウェスタンブロット解析。

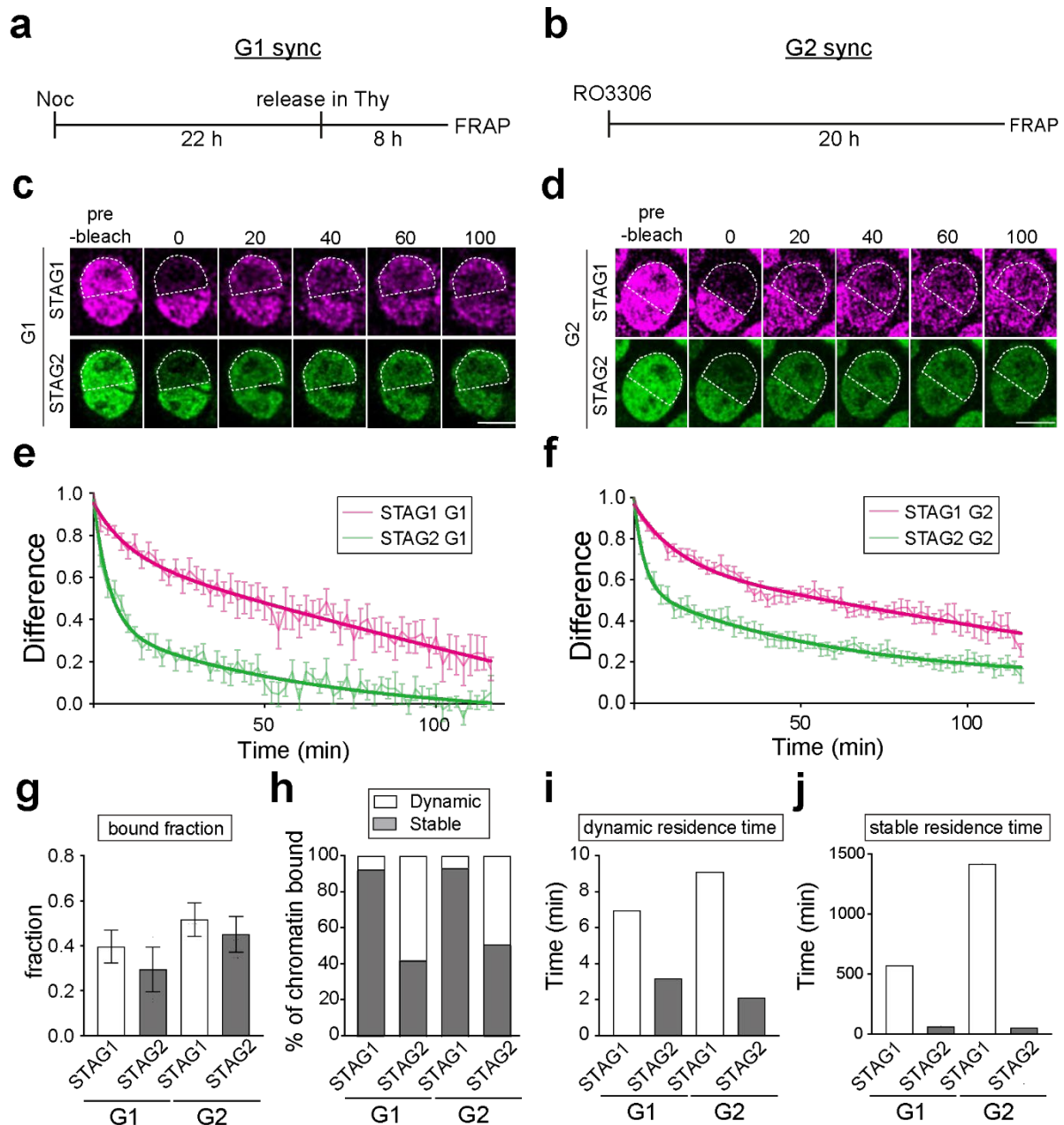


Fig.4-9 STAG1 はクロマチン上で STAG2 よりも安定である

a, b. G1 期 (左) および G2 期 (右) への細胞周期同調の概要図。

c, d. G1 期 (**c**) および G2 期 (**d**) における STAG1-FmC/STAG2-mAmC 発現細胞の inverse FRAP (iFRAP) 実験における細胞画像。スケールバーは 10 μ m。

e, f. G1 細胞 (**e**) および G2 細胞 (**f**) における STAG1-FmC (マゼンタ) および STAG2-mAmC (緑) の正規化蛍光回復曲線。実線は双指数関数によるフィッティング曲線を示す。各条件 10 細胞を解析した。図には平均値と標準誤差を示す。

- g.** G1 および G2 における STAG1-FmC および STAG2-mAmC のクロマチン結合画分の定量。各条件 10 細胞を解析した。図には平均値と標準偏差を示す。
- h. e** および **f** に示した曲線の双指数関数フィッティングから求めた、STAG1-FmC および STAG2-mAmC の動的結合画分および安定結合画分の割合。
- i, j. e** および **f** に示した曲線の双指数関数フィッティングから算出した、G1 および G2 における STAG1-FmC および STAG2-mAmC の動的画分 (**i**) および安定画分 (**j**) のクロマチン結合維持時間。

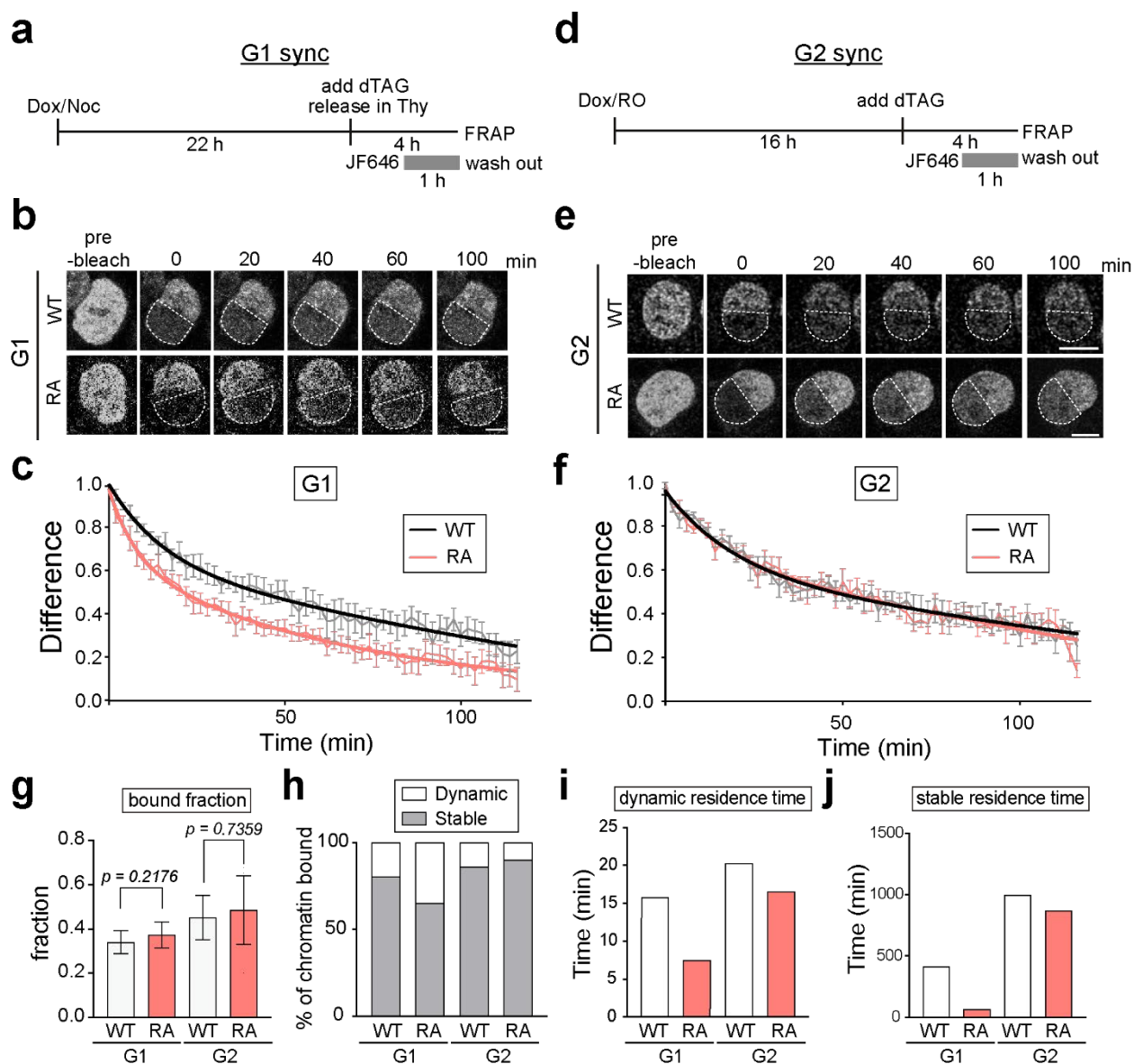


Fig.4-10 AT-hook は G1 期における安定的なクロマチン結合に必要である

- a.** G1 期への細胞周期同調と、外来性 STAG1-WT/RA の FRAP 実験の概要図。STAG1WT-Halo または STAG1RA-Halo は、iFRAP 実験直前に 1 時間 JF646 で標識し、未結合リガンドは直前に wash out した。
- b.** G1 期における STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo 発現細胞の iFRAP 実験から得られた代表的な細胞画像。スケールバーは 10 μm 。
- c.** G1 期における STAG1-WT-Halo (黒) および STAG1-RA-Halo (ピンク) の正規化蛍光回復曲線。実線は双指数関数によるフィッティング曲線を示す。各条件 10 細胞を解析した。図には平均値と標準誤差を示す。

- d. G2 期への細胞周期同調と、外来性 STAG1-WT/RA の FRAP 実験の概要図。
STAG1WT-Halo または STAG1RA-Halo は、iFRAP 実験直前に 1 時間 JF646 で標識し、未結合リガンドは直前に wash out した。
- e. G2 期における STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo 発現細胞の iFRAP 実験から得られた代表的な細胞画像。スケールバーは 10 μm 。
- f. G2 期における STAG1-WT-Halo (黒) および STAG1-RA-Halo (ピンク) の正規化蛍光回復曲線。実線は双指数関数によるフィッティング曲線を示す。各条件 10 細胞を解析した。図には平均値と標準誤差を示す。
- g. G1 および G2 における STAG1-WT-Halo および STAG1-RA-Halo のクロマチン結合分画の定量。各条件 10 細胞を解析した。図には平均値と標準偏差を示す。
- h. 双指数関数フィッティングから求めた、STAG1-WT-Halo および STAG1-RA-Halo の動的結合画分および安定結合画分の割合。
- i, j. 双指数関数フィッティングから算出した、G1 および G2 における STAG1-WT-Halo および STAG1-RA-Halo の動的画分 (i) および安定画分 (j) のクロマチン結合維持時間。

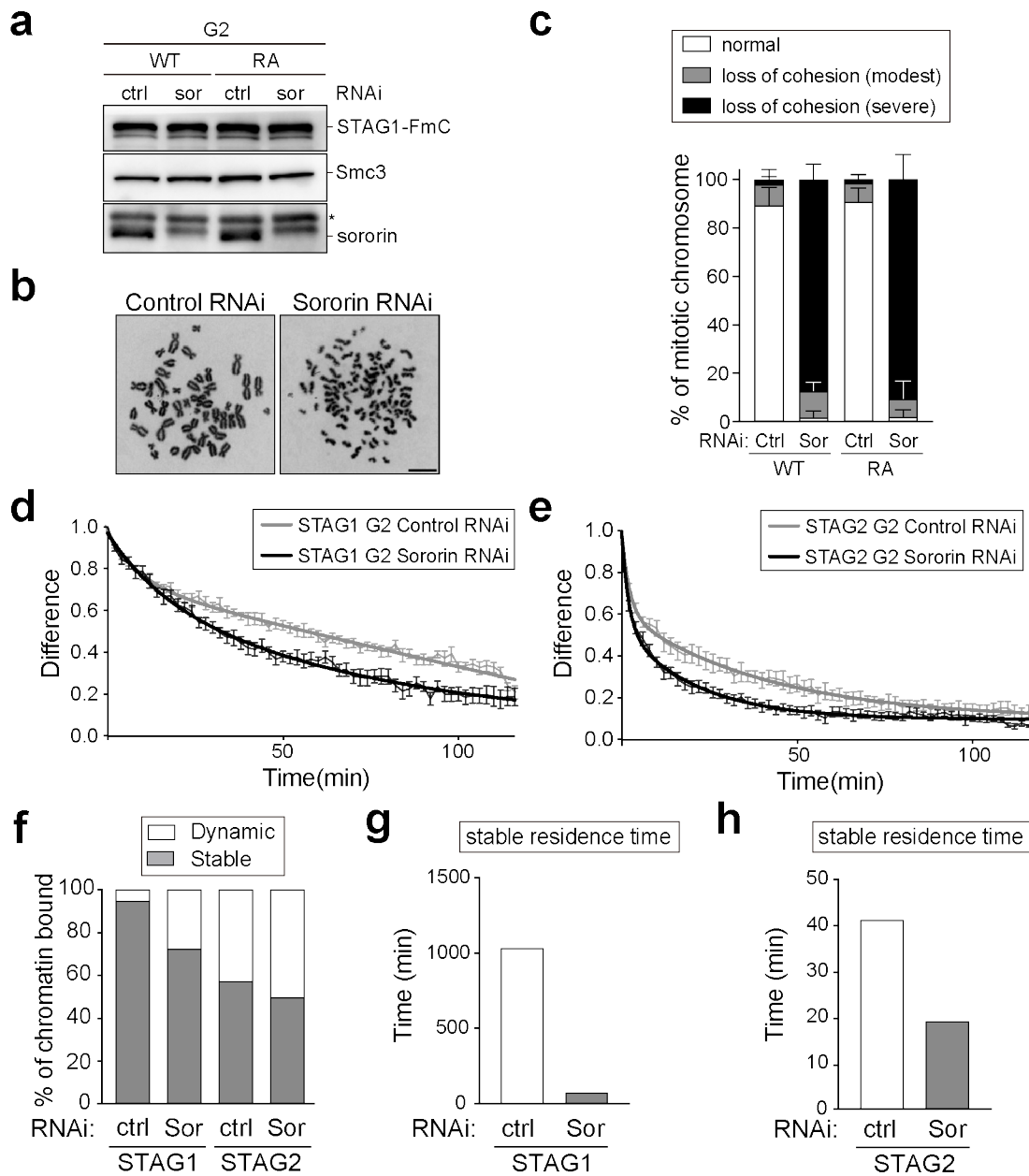


Fig.4-11 G2 期のコヒーシオンは Sororin によって安定化される

- a.** Sororin siRNA を 24 時間処理した後、G2 期に同調した細胞のウェスタンブロット解析。アスタリスクは非特異的シグナルを示す。
- b.** コントロール (左) または Sororin (右) RNAi で処理した細胞の分裂期染色体。スケールバーは 10 μ m。
- c.** 分裂期染色体表現型の定量。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値と標準偏差を示す。各表現型の代表的な画像は Fig.2-13d に示す。

- d, e.** コントロール (グレー) または Sororin (黒) RNAi で処理した G2 期細胞における STAG1-FmC (**d**) および STAG2-mAmC (**e**) の正規化蛍光回復曲線。実線は双指数関数によるフィッティング曲線を示す。各条件 10 細胞を解析した。図には平均値と標準偏差を示す。
- f.** 双指数関数フィッティングから求めた、G2 期細胞における STAG1-FmC および STAG2-mAmC の動的結合画分および安定結合画分の割合。
- g, h.** 双指数関数フィッティングから算出した、G2 期細胞における STAG1-FmC (**g**) および STAG2-mAmC (**h**) の安定結合画分のクロマチン上滞在時間。

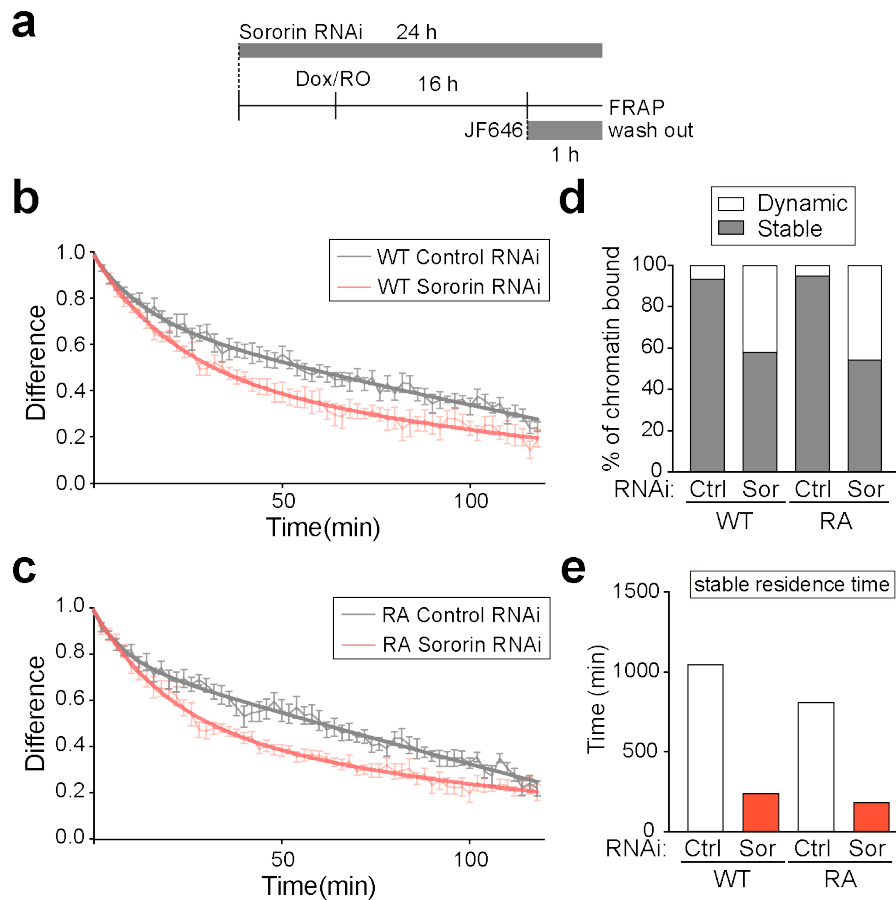


Fig.4-12 G2 期のコヒーシンは AT-hook 非依存的に Sororin によって安定化される

- a.** Sororin RNAi 存在下で G2 期に同調した STAG1WT-Halo または STAG1RA-Halo 発現細胞に対する iFRAP 実験の概要図。
- b, c.** G2 期細胞における STAG1WT-Halo (b) および STAG1RA-Halo (c) の正規化蛍光回復曲線。コントロール RNAi 処理細胞 (グレー) と Sororin RNAi 処理細胞 (ピンク) を比較した。実線は双指数関数によるフィッティング曲線を示す。各条件 10 細胞を解析した。図には平均値と標準偏差を示す。
- d.** 双指数関数フィッティングから求めた、コントロールまたは Sororin RNAi 処理細胞における STAG1-WT-Halo および STAG1-RA-Halo の動的結合画分および安定結合画分の割合。
- e.** 双指数関数フィッティングから算出した、コントロールまたは Sororin RNAi 処理細胞における STAG1WT-Halo および STAG1RA-Halo の安定結合画分のクロマチン結合維持時間。

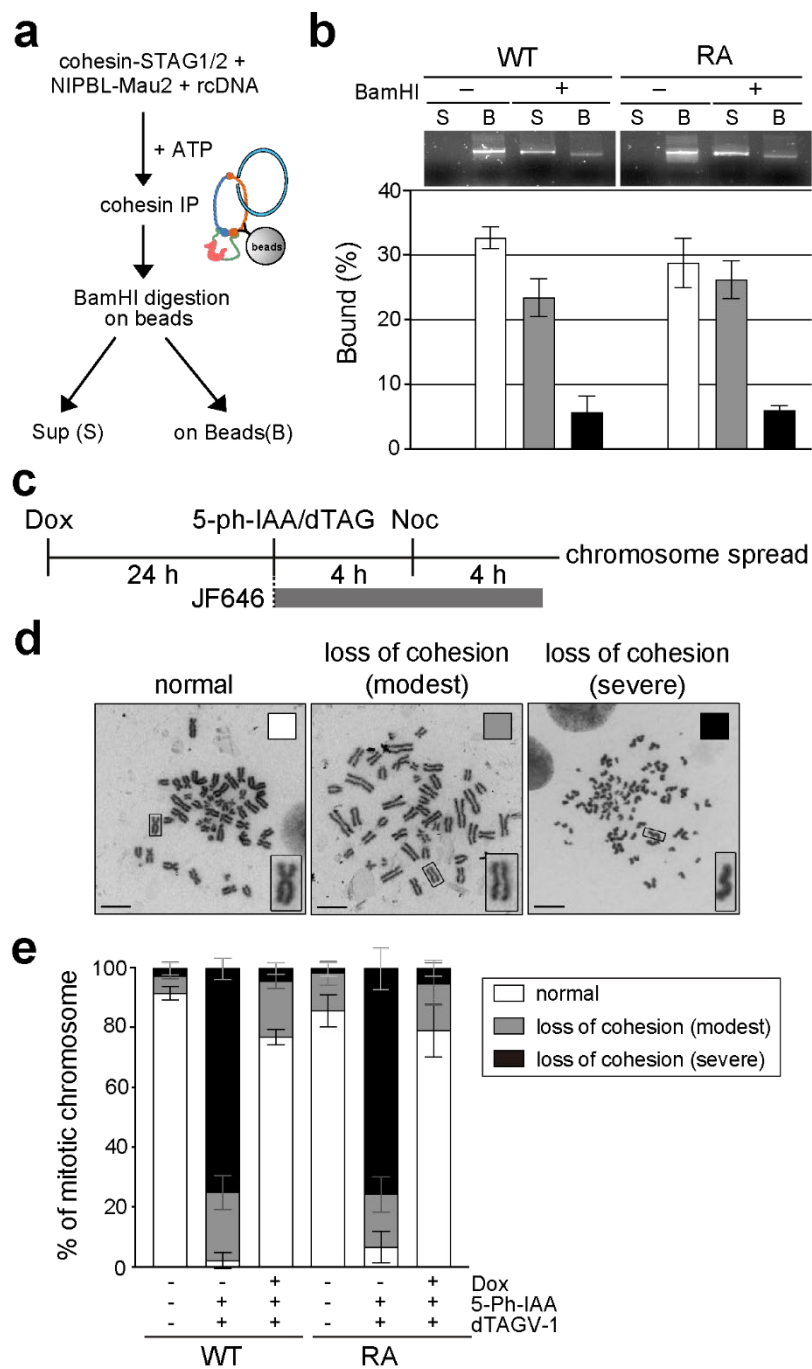


Fig.4-13 姉妹染色分体間接着は AT-hook に依存しない

- a. トポロジカル結合の試験管内再構成のスキーム。コヒーシンと共沈降された環状 DNA を BamHI 処理することでトポロジカルに結合した DNA 量を定量した。
- b. コヒーシンの免疫沈降後、コヒーシン結合 DNA を BamHI で処理し、上清画分 (S) とビーズ結合画分 (B) に分離した。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値と標準偏差が示されている。

- c. 内在性 STAG1/2 の分解および STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo の発現条件下での染色体スプレッド実験の概要。
- d. STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo 発現細胞における分裂期染色体。染色体はギムザ染色により解析した。スケールバーは 10 μm 。
- e, d に示したコヒーシン表現型の定量。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値と標準偏差を示す。

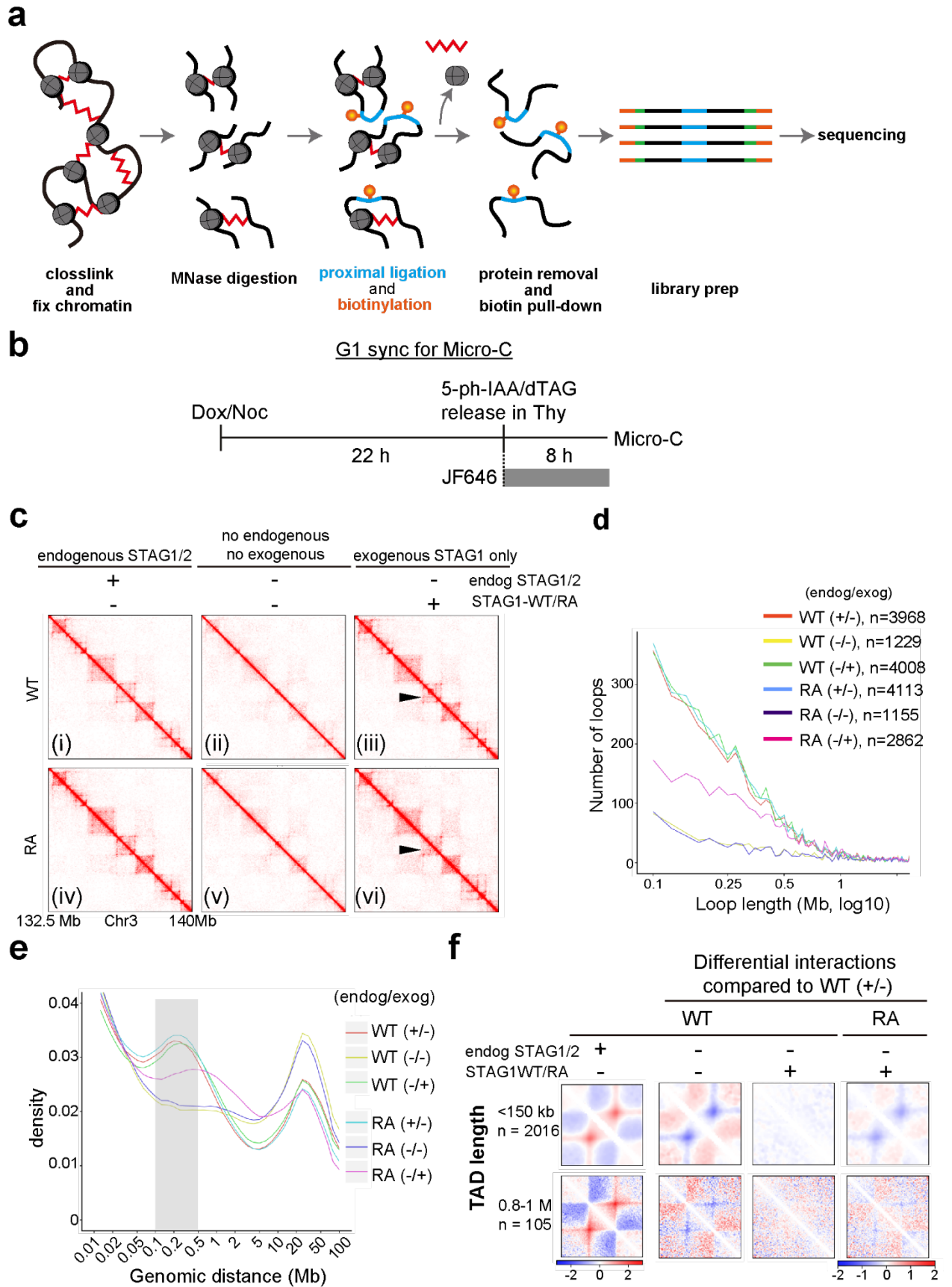


Fig.4-14 AT-hook はクロマチン高次構造形成を促進する

- a. Micro-C による細胞内ゲノム高次構造解析の概要。細胞をホルムアルデヒドおよびクロスリンク試薬で固定した後、マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) で断片化した。その後、近接領域のライゲーショントビオチン化によるプルダウンを行い、次世代シーケンサーにより近接しているゲノム上の領域を同定した。
- b. G1 期に同調した STAG1-WT/RA 発現細胞を用いた Micro-C 実験のスキーム。
- c. 3 番染色体の 132.5–140 Mb 領域における各条件下の Micro-C コンタクトマトリックス (解像度は 25 kbp)。黒の矢じりは、STAG1-WT 発現細胞で観察され STAG1-RA 発現細胞で消失したコンタクトを示す。
- d. 各条件で得られた DNA ループのサイズ毎の数
- e. ゲノム距離に対するコンタクト密度。コヒーシ依存的な相互作用のサイズ範囲は影付きで示した。
- f. 内在性 STAG1/2 非存在下で、外来性 STAG1 が存在する (+) または存在しない (-) 条件において、異なるサイズの TAD ごとに、WT と比較して検出された相互作用の差分。

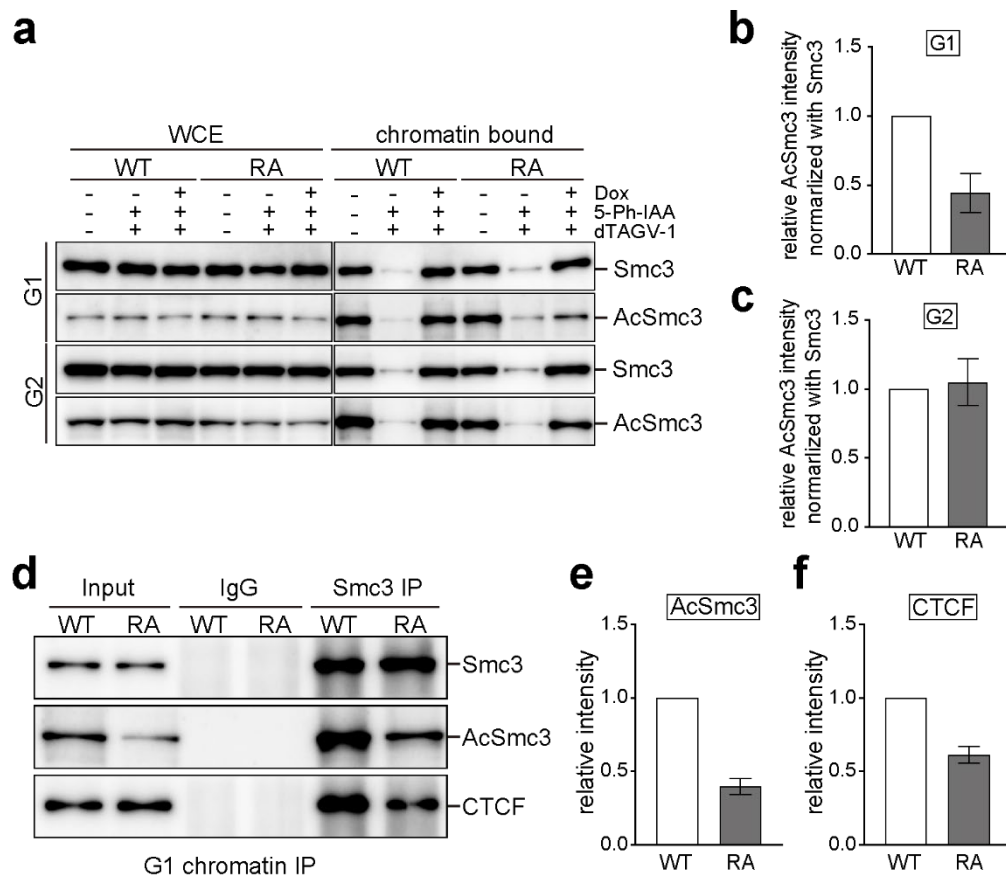


Fig.4-15 AT-hook は Smc3 のアセチル化と CTCF との相互作用を促進する

- a.** G1 期、G2 期に同調した STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo 発現細胞から得られた全細胞抽出物 (WCE) およびクロマチン結合画分における Smc3 およびアセチル化 Smc3 のウェスタンブロット解析。
- b, c.** **a** に示したデータに基づき、G1 期 (**b**) および G2 期 (**c**) の STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo 発現細胞における Smc3 アセチル化 (AcSmc3) シグナルを Smc3 に対する比として定量した。AcSmc3/Smc3 比は STAG1WT 細胞での値で正規化した。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値と標準偏差を示す。
- d.** G1 期に同調し、内在性 STAG1 および STAG2 を分解した STAG1-WT-Halo または STAG1-RA-Halo 発現細胞のクロマチン画分に対する免疫沈降解析。
- e, f.** **d** に示した免疫沈降サンプルにおける AcSmc3 (**e**) および CTCF (**f**) シグナルを Smc3 に対する比として定量した。AcSmc3/Smc3 および CTCF/Smc3 比は STAG1-WT の値で正規化した。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値と標準偏差を示す。

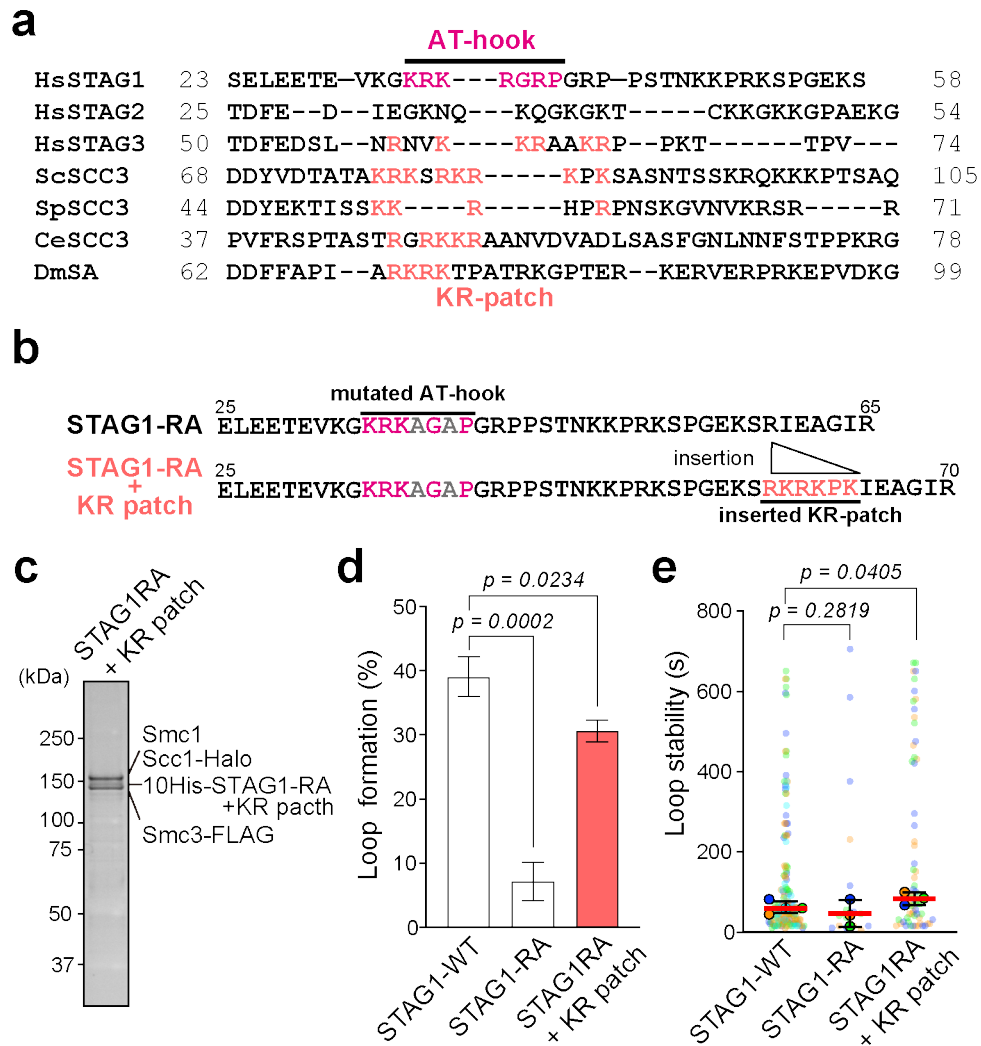


Fig.4-16 STAG1N 末端領域の KR パッチが DNA ループ形成を促進する

- a.** ヒト (Hs) STAG1、STAG2、STAG3、*Schizosaccharomyces pombe* (Sp) Scc3、*Saccharomyces cerevisiae* (Sc) Scc3、*Caenorhabditis elegans* (Ce) Scc3、および *Drosophila melanogaster* (Dm) SA を含む STAG/Sc3 オルソログのマルチプルアラインメント。AT-hook モチーフをマゼンタで、リジンおよびアルギニンに富む (KR) クラスターをピンクで示した。
- b.** 出芽酵母 Scc3 の KR パッチを挿入した STAG1RA の概要図。AT-hook 変異 STAG1 に対して、対応する領域に KR パッチを挿入した。
- c.** SDS-PAGE により分離した KR patch を挿入した STAG1RA を含むコヒーシンの SYPRO Ruby 染色像。

- d. 一分子観察実験により得られた、KR パッチ挿入型 STAG1RA コヒーシンの U 字型 DNA 上での DNA ループ形成頻度。比較のために用いた STAG1-WT と STAG1-RA のデータは Fig.2-3c と同一である。それぞれの条件で 3 回の独立した実験からデータを収集し、DNA は STAG1-RA で 230 個解析した。図には平均値および標準偏差が示されている。P 値は Welch の t 検定により算出した。
- e. KR パッチ挿入型 STAG1RA コヒーシンにより形成された DNA ループの維持時間に基づいて評価した DNA ループの安定性。比較のために用いた STAG1-WT と STAG1-RA のデータは Fig.2-3g と同一である。実線の点は各条件における中央値を示し、同じ実験に由来するデータ点は色分けして示した。赤いバーおよび黒いバーはそれぞれ各実験の中央値の平均および四分位範囲を示す。データは 3 回の独立した実験から収集した (n=24, 21, 19 DNAs)。P 値は Mann-Whitney の U 検定により算出した。

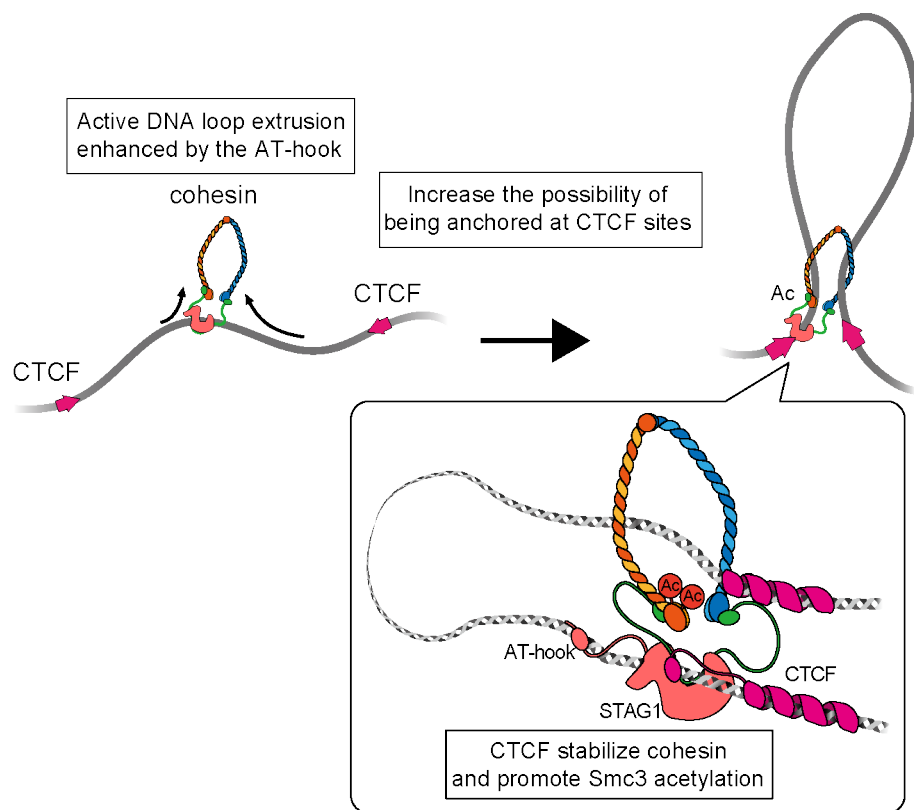


Fig.4-17 AT-hook 依存的な DNA ループ形成によるコヒーシンの安定化

細胞内における AT-hook 依存的なコヒーシン安定化メカニズム。AT-hook は DNA ループ形成を促進することで、クロマチン上のループ押し出しコヒーシンが増加する。DNA ループ押し出しコヒーシンが増加することで **convergent** な CTCF 結合サイトによってアンカリングされるコヒーシン分子数が増加し、さらに CTCF 共局在により **Smc3** アセチル化が促進されることで、コヒーシン分子数がさらに安定化される。CTCF サイトで安定化されたコヒーシンは DNA ループや TAD 境界を規定することで、ゲノム高次構造の形成に働く。

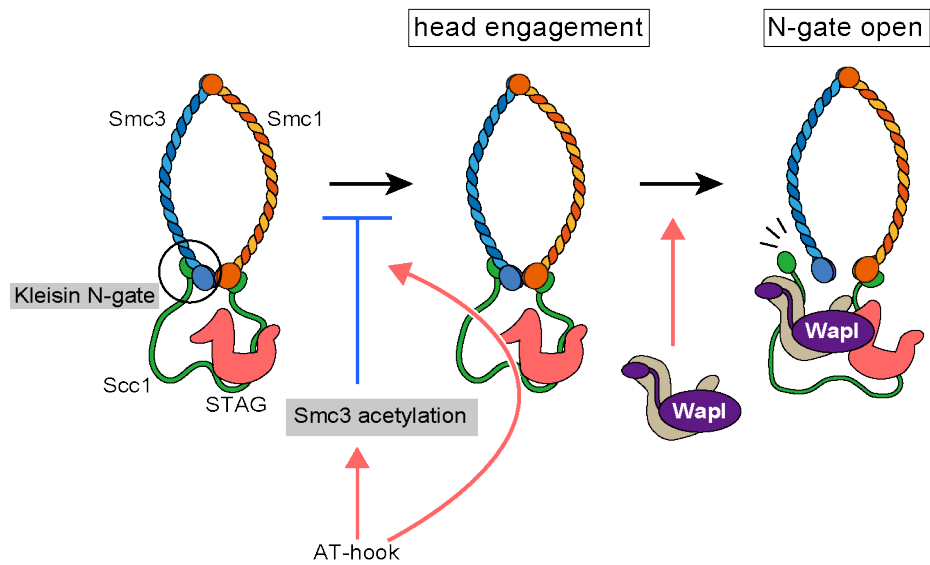


Fig.4-18 Smc3 アセチル化によるコヒーシン安定化機構

Smc3 アセチル化はヘッドドメインの会合状態もしくはこれに先立つ解離を阻害することで Wapl による Kleisin N-gate の解離を抑制する。AT-hook は Smc3 アセチル化を促進することでこの効果を高めるが、AT-hook による安定化が Smc3 アセチル化によるヘッド近傍の構造制御自体に正に働く可能性も考えられる。

第5章 Scc1 フレキシブル領域によるコヒーシン構造変化の制御

5.1 緒言

第3章、第4章の結果から、Smc1、Smc3 のヘッドドメインおよび STAG サブユニットがコヒーシン-DNA 間相互作用の安定性を制御することで、コヒーシン分子機能に寄与していることが示された。最後に、これらのドメイン/サブユニットと相互作用し、複合体の構成に必須な Scc1 に着目した。Scc1 の持つフレキシブル領域はヘッドドメイン間を橋渡しすることから、ヘッドドメインの構造変化に直接的に関与している可能性が考えられる。また、この領域には STAG サブユニットが直接的に結合するため、STAG タンパク質に依存したコヒーシン-DNA 間相互作用の安定化にも、間接的に寄与していることが推察し得る。

この領域の特徴として、その長さが挙げられる。Smc1/3 のヘッドドメイン-ヒンジドメイン間を繋ぐコイルドコイルの長さが約 50 nm であるのに対して、Scc1 フレキシブル領域の長さは 160 nm と見積もることができ、その長さを持ってコヒーシン複合体全体の構造変化や結合した STAG タンパク質の構造的自由度を規定していることが考えられる。従って、本章では、このフレキシブル領域の長さに着目し、フレキシブル領域の短縮がコヒーシンの構造変化に与える影響を解析した。

5.2 結果

5.2.1 Scc1 フレキシブル領域はコヒーシンリング径の拡大に重要である

過去の研究から、Scc1 のもつフレキシブル領域の短縮が DNA ループ形成活性を減少させることが示されている (坂田修士論文)。そこで、このフレキシブル領域の長さが、コヒーシンの構造変化に与える影響を、高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いて解析した。野生型 Scc1 をもつコヒーシンと STAG 結合領域から C 末端 Smc1 結合領域間のアミノ酸を欠失させた変異体 (Scc1^{short}) を精製し ATP 存在下で構造変化を観察した (Fig.5-1a,b)。HS-AFM 観察では、いずれの複合体においても IDR 領域である Scc1 フレキシブル領域は可視化されない一方で、他のサブユニットやヒンジドメインおよびヘッドドメインは明確に観察された (Fig.5-1c)。始めに、フレキシブル領域の短縮が、コヒーシンのリング状構造に与える影響を検証するため、リング構造の面積および Smc1/3 コイルドコイルの中央領域間の距離をリング内径として計測した。リング内の面積は WT と Scc1^{short} で有意な差は見られなかった一方、リングの内径は Scc1^{short} で有意に減少した (Fig.5-1d,e)。さらに、Smc1/3 ヘッドドメイン間の距離を測定したところ、Scc1^{short} ではこの距離が顕著に減少していた (Fig.5-1f)。これらの観察と一致して、フレキシブル領域を短縮した変異体では、Smc1/3 コイルドコイルリング間が極端に近接し複合体全体が伸展した棒状構造を取ることが多く観察された (Fig.5-1c 下)。これを定量的に評価するため、リング内径が 10nm 以下になる頻度を解析したところ、Scc1^{short} ではこの頻度が野生型と比較して顕著に増加した (Fig.5-1g)。以上の結果から、Scc1 フレキシブル領域の長さは、コヒーシンリング内径の増加に重要であることが示された。

5.2.2 Scc1 のフレキシブル領域はコイルドコイルの屈曲を促進する

コヒーシンのリング状構造に着目した解析から、Scc1 フレキシブル領域の短縮がリング内径を縮小し、複合体全体に構造的制約を与えている可能性が示唆された。この可能性をより詳細に解析するため、コイルドコイル領域の屈曲に着目した。Scc1 フレキシブル領域の長さがコイルドコイルの屈曲に与える影響を検証するため、ヒンジドメインとヘッドドメイン間の距離を測定し、野生型と Scc1^{short} で比較した。ヒンジドメインから近い位置にあるヘッドドメイン (proximal head) と遠い位置にあるヘッドドメイン (distal head) の両方に関してヒンジ-ヘッド間距離を測定したところ、興味深いことにフレキシブル領域の短縮によっていずれの距離に関しても有意に増加することがわかった (Fig.5-2a-c)。これがコイルドコイルの屈曲と関係しているかを調べるため、ヒンジ-近位ヘッドドメイン間の距離が 20 nm 以下になる頻度を計測したところ、Scc1^{short} ではこの頻度が減少していることが明らかになった (Fig.5-2d)。以上の結果から、Scc1 のもつフレキシブル領域の長さがコヒーシンリング内径を制御するだけでなく、コイルドコイルの屈曲にも重要であり、複合体全体の構造変化に寄与していることが明らかになった

5.3 考察

5.3.1 Scc1 フレキシブル領域によるコヒーシオン構造変化への寄与

本章の結果から、Scc1 の持つフレキシブル領域の短縮がコヒーシオンのダイナミックな構造変化を阻害することが明らかになった。Scc1 のフレキシブル領域は 1 アミノ酸あたりの大きさを $3.5 \text{ \AA}$ と見積もると約 160 nm の長さを持ち、Smc1/3 ヘッドドメイン間を緩く橋渡しすることでコヒーシオンのリング状構造を形成している。今回の AFM 観察から、野生型においてもヘッドドメイン間距離の最大値は 40 nm 以下であり、ヘッド間の距離の制御にその 4 倍の長さをもつ Scc1 フレキシブル領域が寄与していることは単純には考えにくい。しかしながらフレキシブル領域の 33 nm の短縮で、ヘッドドメイン間の距離は有意に小さくなった (Fig.5-1f)。このメカニズムとして考えられるのは、ヘッドドメインの可動域を制御するための Scc1 フレキシブル領域の“有効長”が実際の長さよりも短いという可能性である。単純計算により見積もられるフレキシブル領域の長さは 160 nm であるが、この領域は STAG や NIPBL といった他のコヒーシオン因子と相互作用していることから、実際にフリーなフレキシブル領域はさらに短いことが考えられる。従って、この 33 nm の欠失がフレキシブル領域の有効長を大幅に減少させ、ヘッドドメイン間に構造的自由度を与えることができる機能的閾値を下回ったため、ヘッド間の構造的制約が高まった可能性が考えられる。

興味深いことに、フレキシブル領域の短縮はヒンジ-ヘッド間距離を増加させ、コイルドコイルの屈曲頻度を低下させた (Fig.5-2)。過去の FRET 解析や HS-AFM 観察から、この屈曲が ATP 加水分解サイクルとカップリングして生じることが示唆されている。ATP 結合がコイルドコイルの伸展を促進するというモデル (Bauer *et al.*, 2021) と、ATP 加水分解がこれを促進するというモデル (Higashi *et al.*, 2021) の双方が提案されているが、いずれにしてもコイルドコイルのダイナミクスはヘッドドメインの構造状態と密接に連動していると考えられる。フレキシブル領域の短縮がヘッド間距離とコイルドコイルの屈曲頻度を同時に減少させたことを考慮すると、コイルドコイルの構造的自由度はヘッドドメイン可動域に強く依存しており、ヘッドドメインの構造的自由度が複合体全体のダイナミックな構造変化に必要である可能性が示唆される。

さらに考えら得る別のメカニズムとして、STAG タンパク質を介したコイルドコイル屈曲促進の減少がある。過去の構造研究から、STAG タンパク質がヒンジドメインと直接相互作用することが報告されている。もしコイルドコイルの屈曲が STAG-ヒンジ間相互作用を介して起こるとすれば、フレキシブル領域の短

縮が Scc1 と結合した STAG とヒンジドメイン間の距離の増加をさせ、両者の相互作用頻度が減少することでコイルドコイルの屈曲頻度を減少させた可能性が考えられる。実際、Scc1 フレキシブル領域の STAG 結合領域から C 末端領域までの距離を見積もると、野生型の 46 nm に対して Scc1^{short} では 12 nm と大幅に短縮されており、STAG タンパク質の複合体内部での動的自由度が著しく制限されたことを支持する。

5.3.2 Scc1 フレキシブル領域依存的な DNA ループ形成メカニズム

前節で述べたようなフレキシブル領域の長さに依存した STAG タンパク質の動的自由度は、DNA ループ形成メカニズムにも密接に関与していると考えられることができる。実際、過去の研究では、フレキシブル領域の短縮により、DNA ループ形成頻度と DNA ループ安定性のいずれも減少することが明らかになっている (坂田修士論文)。また、STAG タンパク質は、先に述べたように DNA ループ形成に必須の DNA 結合領域を持ち、コヒーシン以外の SMC タンパク質による DNA ループ形成メカニズムにおいてもその重要性が示唆されている。よって、フレキシブル領域の長さは複合体全体の構造的ダイナミクスを制御するだけでなく、STAG タンパク質の動的自由度を増加させることで DNA ループ形成を促進している可能性が考えられる。実際、コイルドコイルの屈曲・伸展と共働して、DNA と結合した STAG タンパク質がヘッド・ヒンジ間を移動することで DNA の押出しが起こるモデルも、分子動力学的シミュレーションから支持されている (Higashi *et al.*, 2021)。一方で、先に述べたように、AT-hook モチーフは、IDR 領域に存在していることから、複合体の構造変化に依存せず DNA との追加の相互作用点を与えることで DNA ループ形成に寄与することができると考えられる。このことから、DNA ループ形成における AT-hook による寄与とフレキシブル領域による寄与は時空間的に独立していることが考えられる。即ち、AT-hook によるコヒーシン-DNA 間相互作用の一過的な安定化に続いて、コヒーシン構造変化と DNA ループ形成に必須な DNA 結合領域に依存した DNA ループ形成がフレキシブル領域の長さ依存的に起こると考えられる。実際、フレキシブル領域の短縮は DNA ループ形成頻度だけでなく、DNA ループの安定性も減少させた (坂田修士論文)。また、ラパマイシンアナログによるヘッドドメインの強制的な会合もまた、DNA ループの安定性を減少させた (Sakata *et al.*, 2021)。

以上のことから、フレキシブル領域の長さによるヘッド間距離の制御と複合体全体の構造変化のダイナミックな制御が、DNA-コヒーシン間相互作用の安定性を変化させ、それが DNA ループ形成の初期段階のみでなく、その後のループ

の維持にも寄与していることが推察される。これらを総合すると、DNA ループの形成が

- (i). DNA とコヒーシンの初期相互作用
- (ii). DNA ループ形成の開始に先立つコヒーシン-DNA 間相互作用の安定化
- (iii). ヘッドの解離及び複合体全体の構造変化によるループの形成と維持

という 3 段階に分解され、(i) の DNA とコヒーシンの初期相互作用および、その後の (ii) コヒーシン-DNA 間相互作用の安定化 (これには **gripping** 状態も含まれる) に対して、AT-hook による追加の DNA 相互作用点の提供が寄与しており、続く (iii) DNA ループ形成に必要なヘッドドメインの解離や、複合体全体の構造変化によるコヒーシン-DNA 間相互作用のダイナミックな変化に、フレキシブル領域の長さが寄与していると考えられる。このダイナミックな構造変化と平行して、STAG の保存された DNA 結合領域など、DNA ループ形成に必須な DNA との相互作用が働くことで DNA ループの形成と維持が行われると考えられる (Fig.5-3)。

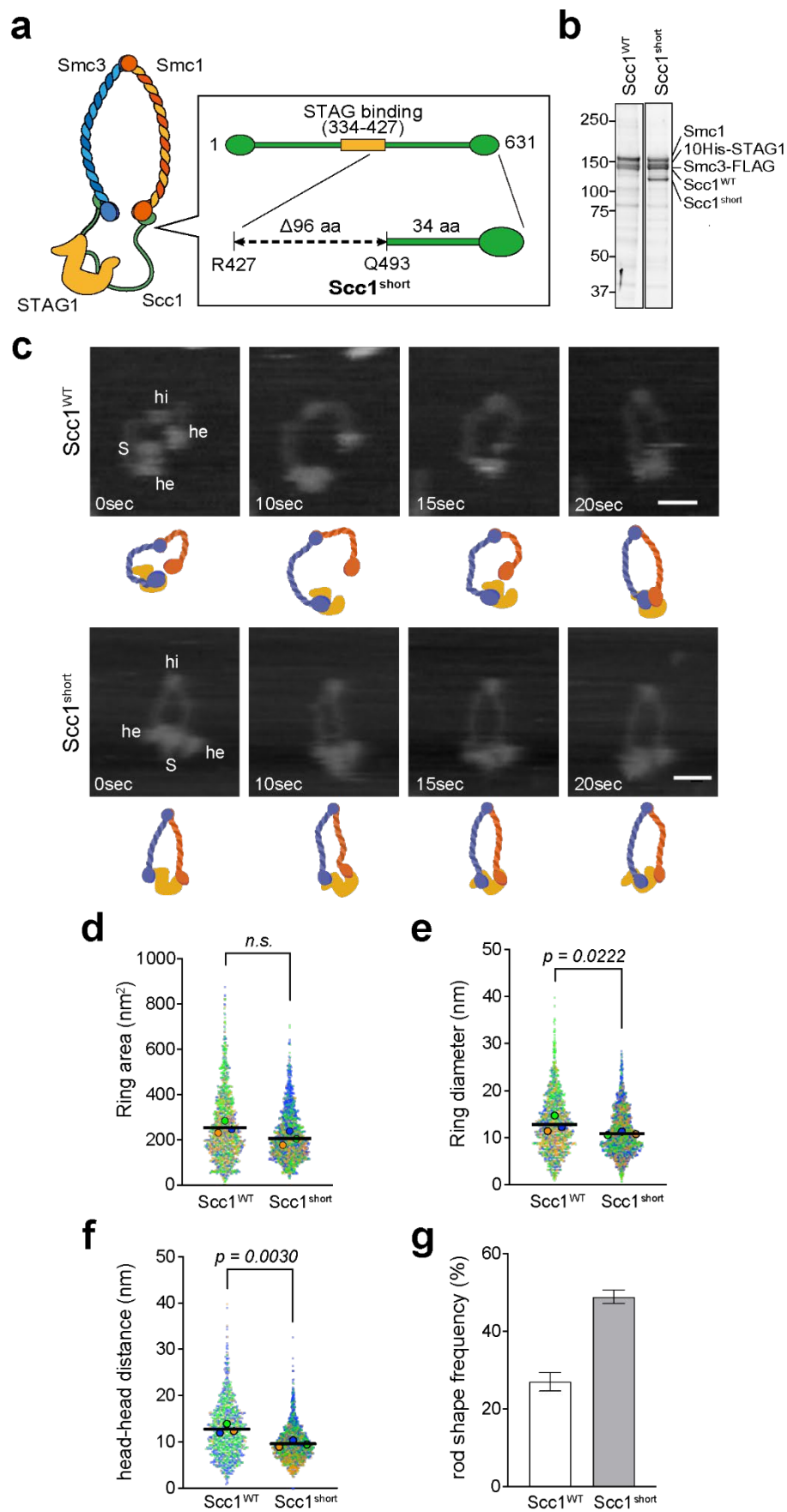


Fig.5-1 Scc1 のフレキシブル領域はコヒーシンリング径の拡大に重要である

- a. Scc1 フレキシブル領域短縮型コヒーシン。Scc1 の Smc1 と Smc3 をつなぐ領域は構造を持たないフレキシブル領域である。このうち Smc1 結合ドメインと STAG1/2 結合ドメイン間の 96 アミノ酸を短縮した Scc1^{short} を作製した。
- b. SDS-PAGE により分離した野生型コヒーシンと短縮型 Scc1 をもつコヒーシンの SYPRO Ruby 染色像。
- c. HS-AFM 観察における野生型コヒーシンおよび Scc1^{short} コヒーシン。ヘッド (he)、ヒンジ (hi)、および STAG1 (S) を示す。スケールバーは 25 nm。
- d, e, f. Scc1^{WT} および Scc1^{short} コヒーシンの HS-AFM 観察におけるリング内面積 (d)、リング内径 (e)、ヘッドドメイン間の距離 (f) の分布。各フレームで測定した値をプロットした。WT で 40 分子、Scc1^{short} で 50 分子のコヒーシンを解析した。実線の点は各条件における中央値を示し、同じ実験に由来するデータ点は色分けして示した。黒いバーは中央値を示す。データは 3 回の独立した実験から収集した (WT; n = 558, 513, 397 frames, Scc1^{short}; n = 1154, 422, 320 frames)。P 値は Mann–Whitney の U 検定により算出した。
- g. コヒーシンが rod-shape 構造を取る頻度を、リング内径が 10 nm 以下となるフレーム数を、総フレーム数で割った値として算出した。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値および標準偏差が示されている。

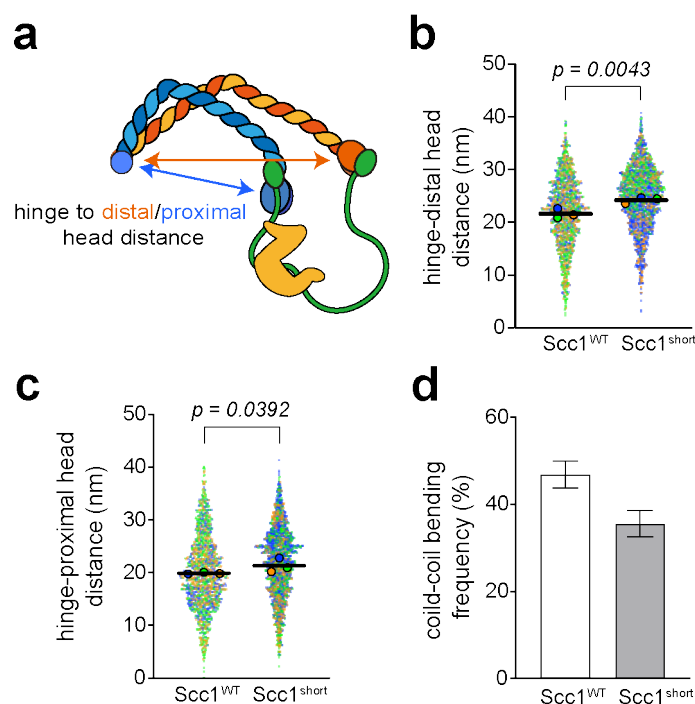


Fig.5-2 Scc1 のフレキシブル領域はコイルドコイルの屈曲を促進する

- a.** ヘッドドメイン、ヒンジドメイン間距離測定の詳細図。ヒンジドメインから近位にあるヘッドを **proximal head**、遠位にあるヘッドを **distal head** として測定した。
- b, c.** Scc1^{WT} および Scc1^{short} コヒーシンの HS-AFM 観察におけるヒンジ-遠位ヘッド間距離 (**b**)、ヒンジ-近位ヘッド間距離 (**c**) の分布。各フレームで測定した値をプロットした。WT で 40 分子、Scc1^{short} で 50 分子のコヒーシンを解析した。実線の点は各条件における中央値を示し、同じ実験に由来するデータ点は色分けして示した。黒いバーは中央値を示す。データは 3 回の独立した実験から収集した (WT; n = 558, 513, 397 frames, Scc1^{short}; n = 1154, 422, 320 frames)。P 値は Mann-Whitney の U 検定により算出した。
- g.** コイルドコイルの屈曲頻度を、ヒンジ-近位ヘッド間距離が 20 nm 以下となるフレーム数を、総フレーム数で割った値として算出した。データは 3 回の独立した実験から収集した。図には平均値および標準偏差が示されている。

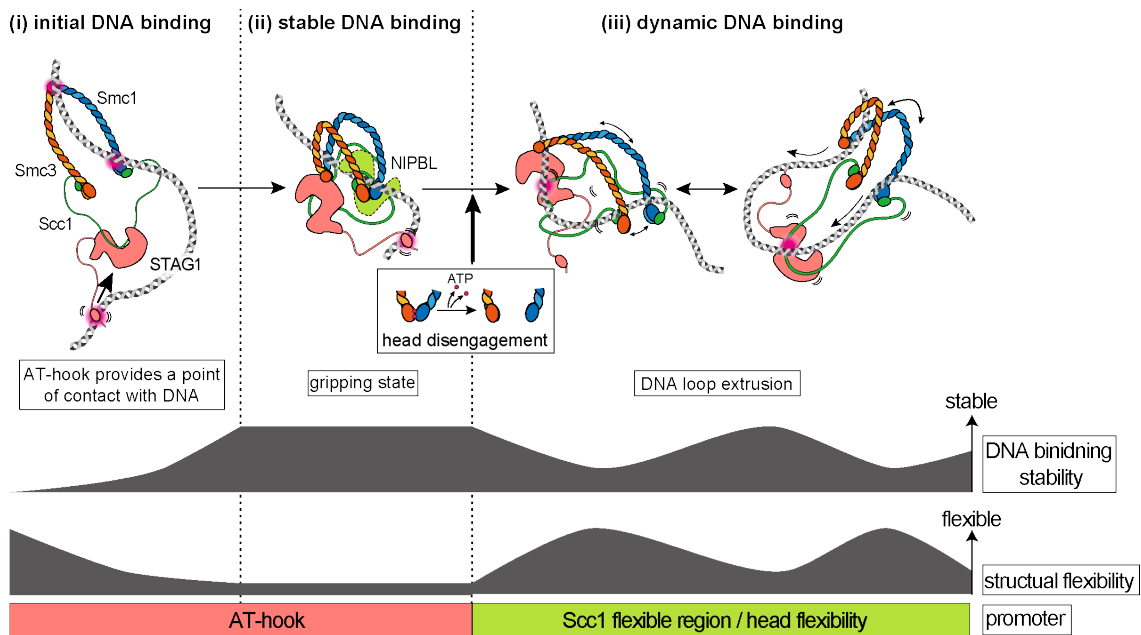


Fig.5-3 コヒーシン依存的な DNA ループ形成メカニズム

コヒーシンの構造変化と DNA 結合安定性の制御による DNA ループの形成。コヒーシンと DNA の初期相互作用 (i) は複合体内の DNA 結合領域 (i.e.Smc1/3 ヘッドドメイン、ヒンジドメイン) によって達成される。AT-hook はこれらに加え追加の DNA との相互作用点を提供することでコヒーシン-DNA 間相互作用を安定化する。初期相互作用に続いて、ヘッドドメイン会合と NIPBL-Mau2 による **gripping** 状態で DNA が強固に安定化される (ii)。ATP 加水分解によるヘッドドメインの解離はコヒーシン-DNA 間相互作用の安定性を減少させ、複合体と DNA に構造的自由度を与える。フレキシブル領域の長さが、ヘッドドメインの移動度と複合体、STAG タンパク質の構造的自由度を規定し、複合体全体の構造変化とそれに伴う DNA 結合のダイナミックな変化が DNA ループの形成を可能とする (iii)。

第6章 総括

本研究により、1.ヘッドドメインの会合によるコヒーシンの過剰な安定化が DNA ループ形成活性を阻害すること、2. STAG1 が AT-hook 依存的な高い DNA 結合安定性により DNA ループ形成とゲノム高次構造形成を促進すること、3. Scc1 フレキシブル領域の長さが複合体の構造変化に重要であることが示された。これらの結果から、コヒーシン-DNA 間相互作用の安定性および複合体の構造的自由度の適切な制御が DNA ループ形成機能に重要であることが示唆された (第5章 3.2 参照)。最後に、得られた結果を踏まえてコヒーシンの主たる分子機能である姉妹染色分体間接着とゲノム高次構造形成のメカニズム的差違について考察し、総括とする。

姉妹染色分体間接着とゲノム高次構造形成の相違点

(i) トポロジカル結合と DNA ループ形成の分子メカニズム的差違

本研究の結果から、DNA ループ形成効率が AT-hook の存在に強く依存している一方で、AT-hook はコヒーシンのトポロジカル結合活性や細胞内における姉妹染色分体間接着には必要でないことが示された。また、過去の実験から、ヘッドドメインを強制的に会合させてもトポロジカル結合が可能であること (Sakata *et al.*, 2021)、さらに Scc1 フレキシブル領域の短縮がこの活性に影響しないことが示されている (坂田修士論文) このことは、トポロジカル結合と DNA ループ形成、延いては姉妹染色分体間接着とゲノム高次構造形成が異なるメカニズムによって達成されることを示唆している。実際に、これまでの報告でも、DNA ループ形成にトポロジカル結合が必要でないことや、DNA ループ形成が可能であるにもかかわらず接着不全を示すヒンジドメイン変異体、逆に DNA ループ形成機能を欠く一方で接着は可能な酵母 Scc3 変異体が同定されている (Barth *et al.*, 2023; Davidson *et al.*, 2019; Guérin *et al.*, 2024; Nagasaka *et al.*, 2023; Pradhan *et al.*, 2022)。

トポロジカル結合と DNA ループ形成を分子メカニズム的に区別する要素として先行研究により示唆されているのが Smc3 と Scc1 の結合界面からなる Kleisin N-gate である (Fig.6a)。序論で述べたように、コヒーシンと DNA の初期結合からトポロジカル結合、または DNA ループ形成に先立つ前駆状態として、コヒーシンと DNA が安定的に相互作用する *gripping* 状態の存在が示されている (Higashi *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020)。トポロジカル結合に際しては、この *gripping*

状態で Kleisin N-gate を DNA が通過していることが前提条件となり、これに続くヘッドドメインの解離により DNA がリング内部への捕捉が可能となる。一方で、DNA が N-gate の通過を伴わずに **gripping** 状態に至った場合、続くヘッドの解離とコイルドコイルのスイングモーションによって DNA はループ状に押し出される。これが繰り返されることでループが拡大してゆく、というモデルが提唱されている (Fig.6b) (Higashi *et al.*, 2021)。実際、DNA ループはコヒーシンスバユニット間の結合界面を全てケミカルクロスリンキングにより結合させた“閉じた”コヒーシンでも可能であり (Davidson *et al.*, 2019)、Smc3 と Scc1 を融合させ、N-gate の DNA の通過を物理的に不可能にしたコンストラクトにおいても DNA ループ形成は野生型と同等に観察される (坂田修士論文)。これらを加味すると、前駆状態における N-gate の DNA の通過/非通過がトポロジカル結合と DNA ループ形成をメカニズム的に分離する要素の 1 つである可能性は十分に考えられる。本研究で示されたように、AT-hook はおそらく **gripping** 状態も含めてコヒーシン-DNA 間相互作用を安定化するが、AT-hook が N-gate の解離に対して直接的に影響することは、AT-hook の変異がトポロジカル結合効率を変化させないことを考慮すると考えにくい。おそらく DNA が N-gate を通過していない **gripping** 状態、即ち DNA ループ形成の前駆状態は、N-gate を通過していない分 DNA の自由度が高く、N-gate を通過したトポロジカル結合の前駆状態と比較して相対的に不安定であると考えられる (N-gate の通過後、DNA はフレキシブル領域とヘッドドメイン間の空間にトラップされるため)。AT-hook は N-gate の開閉を直接的に制御するよりむしろ、このような相対的に不安定な前駆状態を安定化することで、結果的に DNA ループ押し出し反応を起こすに足る基盤を確立する役割があると推察できる (Fig.6b)。

一方、その先に起こる反応に関しても、DNA ループ押し出しとトポロジカル結合で差があると考えられる。その差の代表的なものがコヒーシンの構造的自由度である。DNA をリング状構造の内側に捕捉する反応がコヒーシンのダイナミックな構造変化を必要としないことは直感的に想像し得るが、先に述べたようにトポロジカル結合への必要条件としては Scc1 と Smc3 の結合界面の局所的な開口と、それに続くヘッドドメインの一時的な解離が示されているのみであり、この反応がヘッドドメイン付近の限定的な構造変化によって完結することが示唆されている (Buheitel & Stemmann, 2013; Higashi *et al.*, 2020; Murayama & Uhlmann, 2015)。これに対して DNA ループ形成は、考察 5.3.2 で述べたようにコヒーシンのダイナミックな構造変化による DNA-コヒーシン間相互作用の連続的な変化を必要とするため、フレキシブル領域の短縮や追加の足場となる AT-hook の変異に対してよりセンシティブであると考えられる。したがって、トポロジカル結合がリングの開閉とコヒーシン安定化という一方向性の反応のみを

必要とする一方で、DNA ループ形成はコヒーシンの安定化、不安定化の連続的なサイクルによって DNA との相互作用を連続的に変化させるより複雑な反応であると言える。

(ii) 細胞内における接着と DNA ループ形成の棲み分け

このように両者が異なったメカニズムで達成される場合、細胞内においても接着に働く接着型コヒーシン (cohesive cohesin) と、ゲノム高次構造形成に働く DNA ループ押し出し型コヒーシン (loop extruding cohesin) が機能的に棲み分けられていると考えるのが妥当である。さらに、この 2 つの機能を分けるのがコヒーシンの構造変化と DNA 結合安定性であるとするれば、細胞内では Sororin や NIPBL などの因子がコヒーシンと DNA 結合状態を制御することで、接着型とループ押し出し型のバランスを調節している可能性が示唆される。実際、これまでの研究および本研究でも示されたように G1 期と比較して G2 期はクロマチン上でより安定であることがわかっている (Gerlich *et al.*, 2006; Sakata *et al.*, 2021)。これは、先にも述べたように、Smc3 アセチル化とそれに続く Sororin による安定化を受けるためである。Sororin は HEAT リpeatタンパク質である Pds5 を介してコヒーシンと結合し、コヒーシン解離因子である WAPL との結合と競合することでコヒーシンの解離を抑制することが知られている (Goto *et al.*, 2017; Nishiyama *et al.*, 2010; Ouyang *et al.*, 2016)。一方で、Pds5 存在下では DNA ループ形成が阻害されることが報告されていることから (Davidson *et al.*, 2019)、おそらく Pds5-Sororin の結合がコヒーシンに何らかの構造的制約を与えることが推察できる。また、これまでの知見から Pds5 がコヒーシンの ATP 加水分解活性を阻害することも示されており (Petela *et al.*, 2018)、Pds5-Sororin の結合はヘッドドメイン周辺の構造変化に直接作用している可能性が高い。

興味深いことに、本研究でのヘッドドメインの強制的な会合は、過剰な姉妹染色分体間接着を引き起こし、染色体ブリッジや染色体不分離を伴う M 期から G1 期への移行の阻害を誘導した (Fig.1-3)。過去の報告から、G2 期における、WAPL の分解によるクロマチン上の DNA ループ押し出しコヒーシンの増加が、姉妹染色分体間の分離 (sister chromatid resolution) を促進することが示されており (Batty *et al.*, 2023)、DNA ループ押し出しが姉妹染色分体間の分離に寄与し得ることはポリマーシミュレーションからも示されている (Goloborodko *et al.*, 2016)。すなわち、接着型の安定コヒーシンが、ヘッドの解離を必要条件とする DNA ループ押し出し型コヒーシンへと“モードチェンジ”することが染色体分離に必要であると考えられる。即ち Sororin の結合は、おそらくヘッドドメインを中心にコヒーシ

ンに構造的制約を与え、ヘッドドメインの解離に続く複合体のダイナミックな構造変化を抑制することで、接着型コヒーシンの安定性を担保しているものと考えられる。対照的に G1 期においては Sororin の存在量が劇的に減少することから (Nishiyama *et al.*, 2010; Rankin *et al.*, 2005)、全体としてコヒーシンのクロマチン結合安定性が減少し、構造的自由度の高い DNA ループ押し出し型コヒーシンの割合が増加するということが考えられる。

以上のことを総合すると、分子メカニズム的な側面では、Kleisin N-gate やヘッドドメインの解離、AT-hook による DNA 相互作用点の提供、そして Scc1 フレキシブル領域による複合体全体の構造変化制御の組み合わせにより、コヒーシン-DNA 間相互作用の安定性が変化し、よりダイナミックな反応である DNA ループ形成へと向かうか、もしくはより静的なトポロジカル結合に向かうかが制御されていると考えられる。

細胞内においてはコヒーシン四量体のみならず細胞周期、コンテキスト依存的な制御因子の結合がコヒーシン-DNA 間相互作用の安定性を制御することで、DNA ループ形成型コヒーシン、接着型コヒーシンを機能的に分岐させていると考えることができる。これらの制御因子が、どのような状況 (遺伝子の転写、ゲノムの複製や DNA への損傷など) で、どのように (ヘッドドメインの構造変化に作用するか、複合体全体の構造変化を制限するのか) 働くのかをより細部まで明らかにしていくことが今後の課題であるといえる。

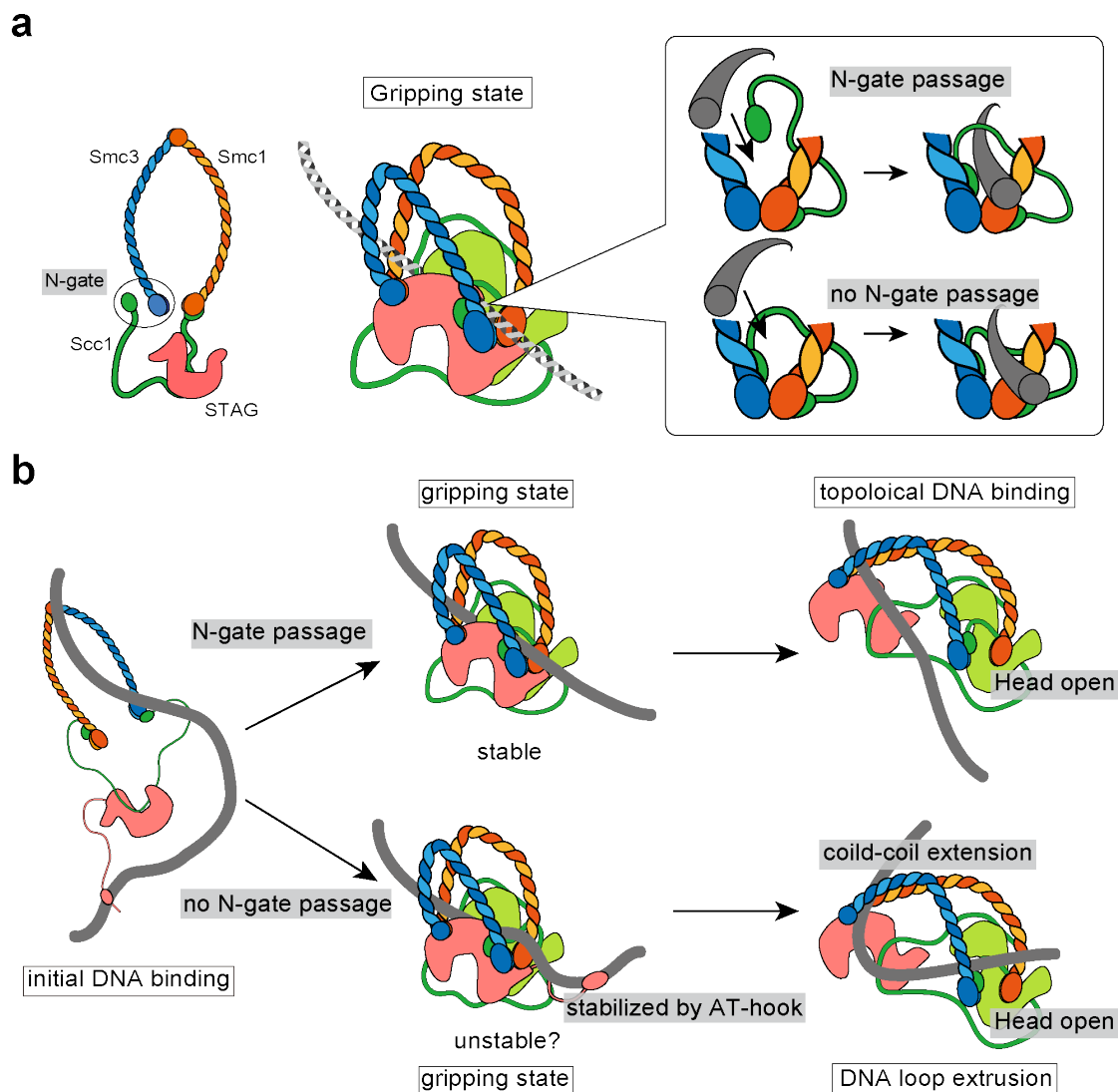


Fig.6 Kleisin N-gate に着目したトポロジカル結合と DNA ループ押出し

- a.** コヒーシンと DNA の安定結合状態である **gripping** 状態においては、DNA が Kleisin N-gate を通過した場合と、通過していない場合の 2 種類の構造を取り得る。
- b.** N-gate を DNA が通過している場合、安定的な **gripping** 状態となり、続くヘッドドメインの解離によって DNA はコヒーシンリング内に捕捉され、トポロジカル結合が達成される。一方、DNA が N-gate を通過していない場合、DNA の自由度が増加し、N-gate 通過の場合と比較して相対的に不安定な状態となり得る。この状態からヘッドが解離し、コイルドコイルが伸展することで DNA ループが押し出される。AT-hook は不安定な **gripping** 状態を安定化することで DNA ループ形成の開始に寄与していると考えられる。

参考文献

- Alomer, R. M., Da Silva, E. M. L., Chen, J., Piekarz, K. M., McDonald, K., Sansam, C. G., Sansam, C. L., & Rankin, S. (2017). Esco1 and Esco2 regulate distinct cohesin functions during cell cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**(37), 9906–9911.
- Alonso-Gil, D., Cuadrado, A., Giménez-Llorente, D., Rodríguez-Corsino, M., & Losada, A. (2023). Different NIPBL requirements of cohesin-STAG1 and cohesin-STAG2. *Nature Communications* 2023 14:1, **14**(1), 1–11.
- Barth, R., Pradhan, B., Kim, E., Davidson, I. F., van der Torre, J., Peters, J. M., & Dekker, C. (2023). Testing pseudotopological and nontopological models for SMC-driven DNA loop extrusion against roadblock-traversal experiments. *Scientific Reports* 2023 13:1, **13**(1), 8100-.
- Bastié, N., Chopard, C., Cournac, A., Nejmi, S., Mboumba, H., Gadai, O., Thierry, A., Beckouët, F., & Koszul, R. (2024). Sister chromatid cohesion halts DNA loop expansion. *Molecular Cell*, **84**(6).
- Batty, P., Langer, C. C., Takács, Z., Tang, W., Blaukopf, C., Peters, J., & Gerlich, D. W. (2023). Cohesin-mediated DNA loop extrusion resolves sister chromatids in G2 phase. *The EMBO Journal*, **42**(16).
- Bauer, B. W., Davidson, I. F., Canena, D., Wutz, G., Tang, W., Litos, G., Horn, S., Hinterdorfer, P., & Peters, J. M. (2021). Cohesin mediates DNA loop extrusion by a “swing and clamp” mechanism. *Cell*, **184**(21), 5448-5464.e22.
- Beckouët, F., Srinivasan, M., Roig, M. B., Chan, K. L., Scheinost, J. C., Batty, P., Hu, B., Petela, N., Gligoris, T., Smith, A. C., Strmecki, L., Rowland, B. D., & Nasmyth, K. (2016). Releasing Activity Disengages Cohesin’s Smc3/Scc1 Interface in a Process Blocked by Acetylation. *Molecular Cell*, **61**(4), 563.

- Bisht, K. K., Daniloski, Z., & Smith, S. (2013). SA1 binds directly to DNA through its unique AT-hook to promote sister chromatid cohesion at telomeres. *Journal of Cell Science*, **126**(15), 3493.
- Bonev, B., & Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nature Reviews. Genetics*, **17**(11), 661–678.
- Buheitel, J., & Stemmann, O. (2013). Prophase pathway-dependent removal of cohesin from human chromosomes requires opening of the Smc3-Scc1 gate. *The EMBO Journal*, **32**(5), 666–676.
- Bürmann, F., Funke, L. F. H., Chin, J. W., & Löwe, J. (2021). Cryo-EM structure of MukBEF reveals DNA loop entrapment at chromosomal unloading sites. *Molecular Cell*, **81**(23), 4891.
- Bürmann, F., Lee, B. G., Than, T., Sinn, L., O'Reilly, F. J., Yatskevich, S., Rappsilber, J., Hu, B., Nasmyth, K., & Löwe, J. (2019). A folded conformation of MukBEF and cohesin. *Nature Structural & Molecular Biology*, **26**(3), 227.
- Bürmann, F., & Löwe, J. (2023). Structural biology of SMC complexes across the tree of life. *Current Opinion in Structural Biology*, **80**, 102598.
- Çamdere, G. O., Carlborg, K. K., & Koshland, D. (2018). Intermediate step of cohesin's ATPase cycle allows cohesin to entrap DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**(39), 9732–9737.
- Cameron, G., Gruszka, D. T., Gruar, R., Xie, S., Kaya, Ç., Nasmyth, K. A., Baxter, J., Srinivasan, M., & Yardimci, H. (2024). Sister chromatid cohesion establishment during DNA replication termination. *Science*, **384**(6691), 119–124.
- Canudas, S., & Smith, S. (2009). Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *Journal of Cell Biology*, **187**(2), 165–173.

- Chan, K. L., Roig, M. B., Hu, B., Beckouët, F., Metson, J., & Nasmyth, K. (2012). Cohesin's DNA exit gate is distinct from its entrance gate and is regulated by acetylation. *Cell*, **150**(5), 961–974.
- Chapard, C., Jones, R., van Oepen, T., Scheinost, J. C., & Nasmyth, K. (2019). Sister DNA Entrapment between Juxtaposed Smc Heads and Kleisin of the Cohesin Complex. *Molecular Cell*, **75**(2), 224.
- Cheng, T. M. K., Heeger, S., Chaleil, R. A. G., Matthews, N., Stewart, A., Wright, J., Lim, C., Bates, P. A., & Uhlmann, F. (2015). A simple biophysical model emulates budding yeast chromosome condensation. *ELife*, **4**(4), 1–22.
- Cipriano, L., Russo, R., Andolfo, I., Manno, M., Piscopo, R., Iolascon, A., & Piscopo, C. (2024). A Novel De Novo STAG1 Variant in Monozygotic Twins with Neurodevelopmental Disorder: New Insights in Clinical Heterogeneity. *Genes* **2024**, *15*(9), 1184.
- Cuadrado, A., Gimé Nez-Llorente, D., Kojic, A., Gó Mez-Ló Pez, G., Marti-Renom, M. A., & Losada, A. (2019). Specific Contributions of Cohesin-SA1 and Cohesin-SA2 to TADs and Polycomb Domains in Embryonic Stem Cells. *Cell Reports*, **27**, 3500–3510.
- Cuadrado, A., Giménez-Llorente, D., De Koninck, M., Ruiz-Torres, M., Kojic, A., Rodríguez-Corsino, M., & Losada, A. (2022). Contribution of variant subunits and associated factors to genome-wide distribution and dynamics of cohesin. *Epigenetics and Chromatin*, **15**(1), 1–15.
- Cuadrado, A., Giménez-Llorente, D., Kojic, A., Rodríguez-Corsino, M., Cuartero, Y., Martín-Serrano, G., Gómez-López, G., Marti-Renom, M. A., & Losada, A. (2019). Specific contributions of cohesin-SA1 and cohesin-SA2 to TADs and polycomb domains in embryonic stem cells. *Cell Rep.*, **27**(12), 3500-3510.e4.
- Dauban, L., Montagne, R., Thierry, A., Lazar-Stefanita, L., Bastié, N., Gadai, O., Cournac, A., Koszul, R., & Beckouët, F. (2020). Regulation of Cohesin-Mediated Chromosome Folding by Eco1 and Other Partners. *Molecular Cell*, **77**(6), 1279-1293.e4.

- Davidson, I. F., Barth, R., Zaczek, M., van der Torre, J., Tang, W., Nagasaka, K., Janissen, R., Kerssemakers, J., Wutz, G., Dekker, C., & Peters, J. M. (2023). CTCF is a DNA-tension-dependent barrier to cohesin-mediated loop extrusion. *Nature* 2023, **616**(7958), 822–827.
- Davidson, I. F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., & Peters, J. M. (2019). DNA loop extrusion by human cohesin. *Science*, **366**(6471), 1338–1345.
- De Koninck, M., Lapi, E., Badía-Careaga, C., Cossío, I., Giménez-Llorente, D., Rodríguez-Corsino, M., Andrada, E., Hidalgo, A., Manzanares, M., Real, F. X., & Losada, A. (2020). Essential roles of cohesin STAG2 in mouse embryonic development and adult tissue homeostasis. *Cell Rep*, **32**(6).
- De Koninck, M., & Losada, A. (2016). Cohesin Mutations in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **6**(12).
- Dekker, C., Haering, C. H., Peters, J. M., & Rowland, B. D. (2023). How do molecular motors fold the genome? *Science*, **382**(6671), 646–648.
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., & Ren, B. (2012). Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions. *Nature*, **485**(7398), 376.
- Dreier, M. R., Bekier, M. E., & Taylor, W. R. (2011). Regulation of sororin by cdk1-mediated phosphorylation. *Journal of Cell Science*, **124**(17), 2976–2987.
- Duff, C., Allawendy, S., Green, A. J., Riordan, M., Carolan, E., & McBrien, J. (2025). Novel STAG2 variant expands Mullegama-Klein-Martinez Syndrome phenotype. *European Journal of Medical Genetics*, **76**, 105024.
- Elbatsh, A. M. O., Haarhuis, J. H. I., Petela, N., Chapard, C., Fish, A., Celie, P. H., Stadnik, M., Ristic, D., Wyman, C., Medema, R. H., Nasmyth, K., & Rowland, B. D. (2016). Cohesin Releases DNA through Asymmetric ATPase-Driven Ring Opening. *Molecular Cell*, **61**(4), 575.

- Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., & Mirny, L. A. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. *Cell Reports*, **15**(9), 2038.
- Ganji, M., Shaltiel, I. A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C. H., & Dekker, C. (2018). Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science*, **360**(6384), 102–105.
- Gerguri, T., Fu, X., Kakui, Y., Khatri, B. S., Barrington, C., Bates, P. A., & Uhlmann, F. (2021). Comparison of loop extrusion and diffusion capture as mitotic chromosome formation pathways in fission yeast. *Nucleic Acids Research*, **49**(3), 1294–1312.
- Gerlich, D., Koch, B., Dupeux, F., Peters, J. M., & Ellenberg, J. (2006). Live-Cell Imaging Reveals a Stable Cohesin-Chromatin Interaction after but Not before DNA Replication. *Current Biology*, **16**(15), 1571–1578.
- Gligoris, T. G., Scheinost, J. C., Bürmann, F., Petela, N., Chan, K. L., Uluocak, P., Beckouët, F., Gruber, S., Nasmyth, K., & Löwe, J. (2014). Closing the cohesin ring: structure and function of its Smc3-kleisin interface. *Science*, **346**(6212), 963.
- Goloborodko, A., Imakaev, M. V., Marko, J. F., & Mirny, L. (2016). Compaction and segregation of sister chromatids via active loop extrusion. *ELife*, **5**.
- Goto, Y., Yamagishi, Y., Shintomi-Kawamura, M., Abe, M., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2017). Pds5 Regulates Sister-Chromatid Cohesion and Chromosome Bi-orientation through a Conserved Protein Interaction Module. *Current Biology*, **27**(7), 1005–1012.
- Gruber, S., Haering, C. H., & Nasmyth, K. (2003). Chromosomal Cohesin Forms a Ring. *Cell*, **112**(6), 765–777.
- Guérin, T. M., Barrington, C., Pobegalov, G., Molodtsov, M. I., & Uhlmann, F. (2024). An extrinsic motor directs chromatin loop formation by cohesin. *The EMBO Journal*, **43**(19), 4173–4196.

- Gutiérrez-Caballero, C., Cebollero, L. R., & Pendás, A. M. (2012). Shugoshins: From protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends in Genetics*, **28**(7), 351–360.
- Haarhuis, J. H. I., van der Weide, R. H., Blomen, V. A., Yáñez-Cuna, J. O., Amendola, M., van Ruiten, M. S., Krijger, P. H. L., Teunissen, H., Medema, R. H., van Steensel, B., Brummelkamp, T. R., de Wit, E., & Rowland, B. D. (2017). The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension. *Cell*, **169**(4), 693–707.e14.
- Haering, C. H., Löwe, J., Hochwagen, A., & Nasmyth, K. (2002). Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex. *Molecular Cell*, **9**(4), 773–788.
- Haering, C. H., Schoffnegger, D., Nishino, T., Helmhart, W., Nasmyth, K., & Löwe, J. (2004). Structure and Stability of Cohesin's Smc1-Kleisin Interaction. *Molecular Cell*, **15**(6), 951–964.
- Hansen, A. S. (2020). CTCF as a boundary factor for cohesin-mediated loop extrusion: evidence for a multi-step mechanism. *Nucleus*, **11**(1), 132.
- Hansen, A. S., Pustova, I., Cattoglio, C., Tjian, R., & Darzacq, X. (2017). CTCF and cohesin regulate chromatin loop stability with distinct dynamics. *ELife*, **6**.
- Hara, K., Zheng, G., Qu, Q., Liu, H., Ouyang, Z., Chen, Z., Tomchick, D. R., & Yu, H. (2014). Structure of cohesin subcomplex pinpoints direct shugoshin–Wapl antagonism in centromeric cohesion. *Nature Structural & Molecular Biology*, **21**(10), 1000–1008.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C. M., Mechtler, K., & Peters, J. M. (2005). Dissociation of Cohesin from Chromosome Arms and Loss of Arm Cohesion during Early Mitosis Depends on Phosphorylation of SA2. *PLOS Biology*, **3**(3), e69.
- Hauf, S., Waizenegger, I. C., & Peters, J. M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science*, **293**(5533), 1320–1323.

- Higashi, T. L., Eickhoff, P., Sousa, J. S., Locke, J., Nans, A., Flynn, H. R., Snijders, A. P., Papageorgiou, G., O'Reilly, N., Chen, Z. A., O'Reilly, F. J., Rappsilber, J., Costa, A., & Uhlmann, F. (2020). A Structure-Based Mechanism for DNA Entry into the Cohesin Ring. *Molecular Cell*, **79**(6), 917-933.e9.
- Higashi, T. L., Pobegalov, G., Tang, M., Molodtsov, M. I., & Uhlmann, F. (2021). A brownian ratchet model for dna loop extrusion by the cohesin complex. *ELife*, **10**.
- Holzmann, J., Fuchs, J., Pichler, P., Peters, J. M., & Mechtler, K. (2011). Lesson from the Stoichiometry Determination of the Cohesin Complex: A Short Protease Mediated Elution Increases the Recovery from Cross-Linked Antibody-Conjugated Beads. *Journal of Proteome Research*, **10**(2), 780.
- Holzmann, J., Politi, A. Z., Nagasaka, K., Hantsche-Grininger, M., Walther, N., Koch, B., Fuchs, J., Dürnberger, G., Tang, W., Ladurner, R., Stocsits, R. R., Busslinger, G. A., Novák, B., Mechtler, K., Davidson, I. F., Ellenberg, J., & Peters, J. M. (2019). Absolute quantification of Cohesin, CTCF and their regulators in human cells. *ELife*, **8**.
- Hou, F., & Zou, H. (2005). Two Human Orthologues of Eco1/Ctf7 Acetyltransferases Are Both Required for Proper Sister-Chromatid Cohesion. *Molecular Biology of the Cell*, **16**(8), 3908.
- Hsieh, T. H. S., Weiner, A., Lajoie, B., Dekker, J., Friedman, N., & Rando, O. J. (2015). Mapping nucleosome resolution chromosome folding in yeast by Micro-C. *Cell*, **162**(1), 108.
- Huth, J. R., Bewley, C. A., Nissen, M. S., Evans, J. N. S., Reeves, R., Gronenborn, A. M., & Clore, G. M. (1997). The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nature Structural Biology*, **4**(8), 657–665.
- Jordan Rowley, M., Poulet, A., Nichols, M. H., Bixler, B. J., Sanborn, A. L., Brouhard, E. A., Hermetz, K., Linsenbaum, H., Csankovszki, G., Aiden, E. L., & Corces, V. G. (2020). Analysis of Hi-C data using SIP effectively identifies loops in organisms from C. Elegans to mammals. *Genome Research*, **30**(3), 447–458.

- Kikuchi, S., Borek, D. M., Otwinowski, Z., Tomchick, D. R., & Yu, H. (2016). Crystal structure of the cohesin loader Scc2 and insight into cohesinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**(44), 12444–12449.
- Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I. J., & Yu, H. (2019). Human cohesin compacts DNA by loop extrusion. *Science*, **366**(6471), 1345–1349.
- Kojic, A., Cuadrado, A., De Koninck, M., Giménez-Llorente, D., Rodríguez-Corsino, M., Gómez-López, G., Le Dily, F., Marti-Renom, M. A., & Losada, A. (2018). Distinct roles of cohesin-SA1 and cohesin-SA2 in 3D chromosome organization. *Nature Structural and Molecular Biology*, **25**(6), 496–504.
- Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., & Haering, C. H. (2017). Structural Basis for a Safety-Belt Mechanism That Anchors Condensin to Chromosomes. *Cell*, **171**(3), 588.
- Lee, B. G., Roig, M. B., Jansma, M., Petela, N., Metson, J., Nasmyth, K., & Löwe, J. (2016). Crystal Structure of the Cohesin Gatekeeper Pds5 and in Complex with Kleisin Scc1. *Cell Reports*, **14**(9), 2108–2115.
- Lehalle, D., Mosca-Boidron, A. L., Begtrup, A., Boute-Benejean, O., Charles, P., Cho, M. T., Clarkson, A., Devinsky, O., Duffourd, Y., Duplomb-Jego, L., Gérard, B., Jacquette, A., Kuentz, P., Masurel-Paulet, A., McDougall, C., Moutton, S., Olivie, H., Park, S. M., Rauch, A., ... Faivre, L. (2017). STAG1 mutations cause a novel cohesinopathy characterised by unspecific syndromic intellectual disability. *Journal of Medical Genetics*, **54**(7), 479–488.
- Li, S., Yu, Y., Zheng, J., Miller-Browne, V., Ser, Z., Kuang, H., Patel, D. J., & Zhao, X. (2023). Molecular basis for Nse5-6 mediated regulation of Smc5/6 functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **120**(45), e2310924120.

- Li, Y., Haarhuis, J. H. I., Sedeño Cacciatore, Á., Oldenkamp, R., van Ruiten, M. S., Willems, L., Teunissen, H., Muir, K. W., de Wit, E., Rowland, B. D., & Panne, D. (2020). The structural basis for cohesin–CTCF-anchored loops. *Nature*, **578**(7795), 472–476.
- Li, Y., Muir, K. W., Bowler, M. W., Metz, J., Haering, C. H., & Panne, D. (2018). Structural basis for Scc3-dependent cohesin recruitment to chromatin. *ELife*, **7**.
- Lin, J., Countryman, P., Chen, H., Pan, H., Fan, Y., Jiang, Y., Kaur, P., Miao, W., Gurgel, G., You, C., Piehler, J., Kad, N. M., Riehn, R., Opresko, P. L., Smith, S., Tao, Y. J., & Wang, H. (2016). Functional interplay between SA1 and TRF1 in telomeric DNA binding and DNA–DNA pairing. *Nucleic Acids Research*, **44**(13), 6363–6376.
- Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R., & Hirano, T. (2000). Identification and Characterization of Sa/Scc3p Subunits in the *Xenopus* and Human Cohesin Complexes. *The Journal of Cell Biology*, **150**(3), 405.
- Marko, J. F., De Los Rios, P., Barducci, A., & Gruber, S. (2019). DNA-segment-capture model for loop extrusion by structural maintenance of chromosome (SMC) protein complexes. *Nucleic Acids Research*, **47**(13), 6956–6972.
- Merkenschlager, M., & Nora, E. P. (2016). CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **17**, 17–43.
- Minamino, M., Higashi, T. L., Bouchoux, C., & Uhlmann, F. (2018). Topological in vitro loading of the budding yeast cohesin ring onto DNA. *Life Science Alliance*, **1**(5).
- Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., & Shirahige, K. (2015). Esco1 Acetylates Cohesin via a Mechanism Different from That of Esco2. *Current Biology*, **25**(13), 1694–1706.
- Mizuguchi, T., Fudenberg, G., Mehta, S., Belton, J. M., Taneja, N., Folco, H. D., FitzGerald, P., Dekker, J., Mirny, L., Barrowman, J., & Grewal, S. I. S. (2014). Cohesin-dependent globules and heterochromatin shape 3D genome architecture in *S. pombe*. *Nature*, **516**(7531), 432–435.

- Muir, K. W., Li, Y., Weis, F., & Panne, D. (2020). The structure of the cohesin ATPase elucidates the mechanism of SMC–kleisin ring opening. *Nature Structural & Molecular Biology*, **27**(3), 233.
- Mullegama, S. V., Klein, S. D., Signer, R. H., Vilain, E., & Martinez-Agosto, J. A. (2018). Mutations in STAG2 cause an X-linked cohesinopathy associated with undergrowth, developmental delay, and dysmorphism: Expanding the phenotype in males. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, **7**(2), e00501.
- Mullegama, S. V., Klein, S. D., Signer, R. H., Vilain, E., & Martinez-Agosto, J. A. (2019). Mutations in STAG2 cause an X-linked cohesinopathy associated with undergrowth, developmental delay, and dysmorphism: Expanding the phenotype in males. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, **7**(2).
- Murayama, Y. (2025). Sister chromatid cohesion through the lens of biochemical experiments. *Current Opinion in Cell Biology*, **93**, 102464.
- Murayama, Y., Samora, C. P., Kurokawa, Y., Iwasaki, H., & Uhlmann, F. (2018). Establishment of DNA-DNA Interactions by the Cohesin Ring. *Cell*, **172**(3), 465.
- Murayama, Y., & Uhlmann, F. (2014). Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring. *Nature*, **505**(7483), 367.
- Murayama, Y., & Uhlmann, F. (2015). DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism. *Cell*, **163**(7), 1628–1640.
- Nabet, B., Roberts, J. M., Buckley, D. L., Paulk, J., Dastjerdi, S., Yang, A., Leggett, A. L., Erb, M. A., Lawlor, M. A., Souza, A., Scott, T. G., Vittori, S., Perry, J. A., Qi, J., Winter, G. E., Wong, K. K., Gray, N. S., & Bradner, J. E. (2018). The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation. *Nature Chemical Biology* **2018**, **14**(5), 431–441.

- Nagano, M., Hu, B., Ogata, K., Umemura, F., Ishikura, Y., Suzuki, S., Katsifis, C. C., Yoshinaga, M., Litos, G., Nagasaka, K., Tang, W., Nosaka, Y., Sasada, H., Wang, H., Kondo, D., Katou, Y., Mizuta, K., Yabuta, Y., Ohta, H., ... Saitou, M. (2025). The mitotic STAG3–cohesin complex shapes male germline nucleome. *Nature Structural and Molecular Biology*, 1–16.
- Nagano, T., Lubling, Y., Várnai, C., Dudley, C., Leung, W., Baran, Y., Mendelson Cohen, N., Wingett, S., Fraser, P., & Tanay, A. (2017). Cell-cycle dynamics of chromosomal organisation at single-cell resolution. *Nature*, **547**(7661), 61.
- Nagasaka, K., Davidson, I. F., Stocsits, R. R., Tang, W., Wutz, G., Batty, P., Panarotto, M., Litos, G., Schleiffer, A., Gerlich, D. W., & Peters, J. M. (2023). Cohesin mediates DNA loop extrusion and sister chromatid cohesion by distinct mechanisms. *Molecular Cell*, **83**(17), 3049–3063.e6.
- Nanni, L., Ceri, S., & Logie, C. (2020). Spatial patterns of CTCF sites define the anatomy of TADs and their boundaries. *Genome Biology*, **21**(1), 197.
- Niki, H., & Yano, K. (2016). In vitro topological loading of bacterial condensin MukB on DNA, preferentially single-stranded DNA rather than double-stranded DNA. *Scientific Reports 2016 6:1*, **6**(1), 1–11.
- Nishiyama, T., Ladurner, R., Schmitz, J., Kreidl, E., Schleiffer, A., Bhaskara, V., Bando, M., Shirahige, K., Hyman, A. A., Mechtler, K., & Peters, J. M. (2010). Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl. *Cell*, **143**(5), 737–749.
- Nomidis, S. K., Carlon, E., Gruber, S., & Marko, J. F. (2022). DNA tension-modulated translocation and loop extrusion by SMC complexes revealed by molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Research*, **50**(9), 4974–4987.
- Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., Van Berkum, N. L., Meisig, J., Sedat, J., Gribnau, J., Barillot, E., Blüthgen, N., Dekker, J., & Heard, E. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation center. *Nature*, **485**(7398), 381.

- Ochi, Y., Kon, A., Sakata, T., Nakagawa, M. M., Nakazawa, N., Kakuta, M., Kataoka, K., Koseki, H., Nakayama, M., Morishita, D., Tsuruyama, T., Saiki, R., Yoda, A., Okuda, R., Yoshizato, T., Yoshida, K., Shiozawa, Y., Nannya, Y., Kotani, S., ... Ogawa, S. (2020). Combined Cohesin-Runx1 Deficiency Synergistically Perturbs Chromatin Looping and Causes Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Discovery*, **10**(6), 836.
- Ouyang, Z., Zheng, G., Song, J., Borek, D. M., Otwinowski, Z., Brautigam, C. A., Tomchick, D. R., Rankin, S., & Yu, H. (2013). Structure of the human cohesin inhibitor Wapl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(28), 11355–11360.
- Ouyang, Z., Zheng, G., Tomchick, D. R., Luo, X., & Yu, H. (2016). Structural Basis and IP6 Requirement for Pds5-dependent Cohesin Dynamics. *Molecular Cell*, **62**(2), 248.
- Panarotto, M., Davidson, I. F., Litos, G., Schleiffer, A., & Peters, J.-M. (2022). Cornelia de Lange syndrome mutations in NIPBL can impair cohesin-mediated DNA loop extrusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **119**(18).
- Petela, N. J., Gligoris, T. G., Metson, J., Lee, B. G., Voulgaris, M., Hu, B., Kikuchi, S., Chapard, C., Chen, W., Rajendra, E., Srinivisan, M., Yu, H., Löwe, J., & Nasmyth, K. A. (2018). Scc2 Is a Potent Activator of Cohesin's ATPase that Promotes Loading by Binding Scc1 without Pds5. *Molecular Cell*, **70**(6), 1134.
- Peters, J. M., & Nishiyama, T. (2012). Sister Chromatid Cohesion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4**(11), a011130.
- Pezzi, N., Prieto, I., Kremer, L., Pé, L. A., Jurado, R., Valero, C., Jesu's, J. J., Mazo, D., Marti'nez, C., Marti'nez-A, M., & Barbero, J. L. (2000). STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *The FASEB Journal*, **14**(3), 581–592.
- Pradhan, B., Barth, R., Kim, E., Davidson, I. F., Bauer, B., van Laar, T., Yang, W., Ryu, J. K., van der Torre, J., Peters, J. M., & Dekker, C. (2022). SMC complexes can traverse physical roadblocks bigger than their ring size. *Cell Reports*, **41**(3), 111491.

- Rankin, S., Ayad, N. G., & Kirschner, M. W. (2005). Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates. *Molecular Cell*, **18**(2), 185–200.
- Rao, S. S. P., Huang, S. C., Glenn St Hilaire, B., Engreitz, J. M., Perez, E. M., Kieffer-Kwon, K. R., Sanborn, A. L., Johnstone, S. E., Bascom, G. D., Bochkov, I. D., Huang, X., Shamim, M. S., Shin, J., Turner, D., Ye, Z., Omer, A. D., Robinson, J. T., Schlick, T., Bernstein, B. E., ... Aiden, E. L. (2017). Cohesin loss eliminates all loop domains. *Cell*, **171**(2), 305.
- Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., Sanborn, A. L., Machol, I., Omer, A. D., Lander, E. S., & Aiden, E. L. (2014). A three-dimensional map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, **159**(7), 1665.
- Remeseiro, S., Cuadrado, A., Gómez-López, G., Pisano, D. G., & Losada, A. (2012). A unique role of cohesin-SA1 in gene regulation and development. *EMBO Journal*, **31**(9), 2090–2102.
- Richeldi, M., Pobegalov, G., Higashi, T. L., Gmurczyk, K., Uhlmann, F., & Molodtsov, M. I. (2023). Mechanical disengagement of the cohesin ring. *Nature Structural & Molecular Biology* 2023, **31**(1), 23–31.
- Rowley, M. J., Nichols, M. H., Lyu, X., Ando-Kuri, M., Rivera, I. S. M., Hermetz, K., Wang, P., Ruan, Y., & Corces, V. G. (2017). Evolutionarily Conserved Principles Predict 3D Chromatin Organization. *Molecular Cell*, **67**(5), 837-852.e7.
- Sakata, R., Niwa, K., Ugarte La Torre, D., Gu, C., Tahara, E., Takada, S., & Nishiyama, T. (2021). Opening of cohesin's SMC ring is essential for timely DNA replication and DNA loop formation. *Cell Reports*, **35**(4).
- Schmidt, D., Schwalie, P. C., Ross-Innes, C. S., Hurtado, A., Brown, G. D., Carroll, J. S., Flicek, P., & Odom, D. T. (2010). A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Research*, **20**(5), 578.

- Schmitz, J., Watrin, E., Lénárt, P., Mechtler, K., & Peters, J. M. (2007). Sororin Is Required for Stable Binding of Cohesin to Chromatin and for Sister Chromatid Cohesion in Interphase. *Current Biology*, **17**(7), 630–636.
- Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A., & Cavalli, G. (2012). Three-Dimensional Folding and Functional Organization Principles of the Drosophila Genome. *Cell*, **148**(3), 458–472.
- Shaltiel, I. A., Datta, S., Lecomte, L., Hassler, M., Kschonsak, M., Bravo, S., Stober, C., Ormanns, J., Eustermann, S., & Haering, C. H. (2022). A hold-and-feed mechanism drives directional DNA loop extrusion by condensin. *Science*, **376**(6597), 1087–1094.
- Shi, Z., Gao, H., Bai, X. C., & Yu, H. (2020). Cryo-EM structure of the human cohesin-NIPBL-DNA complex. *Science*, **368**(6498), 1454–1459.
- Soardi, F. C., Machado-Silva, A., Linhares, N. D., Zheng, G., Qu, Q., Pena, H. B., Martins, T. M. M., Vieira, H. G. S., Pereira, N. B., Melo-Minardi, R. C., Gomes, C. C., Gomez, R. S., Gomes, D. A., Pires, D. E. V., Ascher, D. B., Yu, H., & Pena, S. D. J. (2017). Familial stag2 germline mutation defines a new human cohesinopathy. *Npj Genomic Medicine*, **2**(1), 1–11.
- Srinivasan, M., Fumasoni, M., Petela, N. J., Murray, A., & Nasmyth, K. A. (2020). Cohesion is established during dna replication utilising chromosome associated cohesin rings as well as those loaded de novo onto nascent dnas. *ELife*, **9**, 1–27.
- Srinivasan, M., Petela, N. J., Scheinost, J. C., Collier, J., Voulgaris, M., Roig, M. B., Beckouët, F., Hu, B., & Nasmyth, K. A. (2019). Scc2 counteracts a wapl-independent mechanism that releases cohesin from chromosomes during G1. *ELife*, **8**.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H., & Peters, J. M. (2000). Characterization of Vertebrate Cohesin Complexes and Their Regulation in Prophase. *Journal of Cell Biology*, **151**(4), 749–762.

- Tang, M., Pobegalov, G., Tanizawa, H., Chen, Z. A., Rappsilber, J., Molodtsov, M., Noma, K. ichi, & Uhlmann, F. (2023). Establishment of dsDNA-dsDNA interactions by the condensin complex. *Molecular Cell*, **83**(21), 3787-3800.e9.
- Taschner, M., Er^ Ome Basquin, J., Steigenberger, B., Sch€ Afer, I. B., Soh, Y.-M., Basquin, C., Lorentzen, E., R€ Aschle, M., Scheltema, R. A., & Gruber, S. (2021). Nse5/6 inhibits the Smc5/6 ATPase and modulates DNA substrate binding. *The EMBO Journal*, **40**(15).
- Taschner, M., & Gruber, S. (2023). DNA segment capture by Smc5/6 holocomplexes. *Nature Structural & Molecular Biology* 2023, **30**(5), 619–628.
- Uhlmann, F. (2025). A unified model for cohesin function in sister chromatid cohesion and chromatin loop formation. *Molecular Cell*, **85**(6), 1058–1071.
- Uhlmann, F., Lottspelch, F., & Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*, **400**(6739), 37–42.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V., & Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell*, **103**(3), 375–386.
- van Ruiten, M. S., van Gent, D., Sedeño Cacciatore, Á., Fauster, A., Willems, L., Hekkelman, M. L., Hoekman, L., Altelaar, M., Haarhuis, J. H. I., Brummelkamp, T. R., de Wit, E., & Rowland, B. D. (2022). The cohesin acetylation cycle controls chromatin loop length through a PDS5A brake mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology* 2022, **29**(6), 586–591.
- Viny, A. D., Bowman, R. L., Liu, Y., Lavallée, V. P., Eisman, S. E., Xiao, W., Durham, B. H., Navitski, A., Park, J., Braunstein, S., Alija, B., Karzai, A., Csete, I. S., Witkin, M., Azizi, E., Baslan, T., Ott, C. J., Pe’er, D., Dekker, J., ... Levine, R. L. (2019). Cohesin members Stag1 and Stag2 display distinct roles in chromatin accessibility and topological control of HSC self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*, **25**(5), 682.

- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A., & Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*, **103**(3), 399–410.
- Wells, J. N., Gligoris, T. G., Nasmyth, K. A., & Marsh, J. A. (2017). Evolution of condensin and cohesin complexes driven by replacement of Kite by Hawk proteins. *Current Biology*, **27**(1), R17–R18.
- Wilhelm, L., Bürmann, F., Minnen, A., Shin, H. C., Toseland, C. P., Oh, B. H., & Gruber, S. (2015). SMC condensin entraps chromosomal DNA by an ATP hydrolysis dependent loading mechanism in *Bacillus subtilis*. *ELife*, **4**, e06659.
- Wutz, G., Ladurner, R., St Hilaire, B. G., Stocsits, R. R., Nagasaka, K., Pignard, B., Sanborn, A., Tang, W., Varnai, C., Ivanov, M. P., Schoenfelder, S., Van Der Lelij, P., Huang, X., Durnberger, G., Roitinger, E., Mechtler, K., Finley Davidson, I., Fraser, P., Lieberman-Aiden, E., & Peters, J. M. (2020). ESCO1 and CTCF enable formation of long chromatin loops by protecting cohesinstag1 from WAPL. *ELife*, **9**.
- Wutz, G., Várnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D. A., Stocsits, R. R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M. J., Walther, N., Koch, B., Kueblbeck, M., Ellenberg, J., Zuber, J., Fraser, P., & Peters, J. (2017). Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins. *The EMBO Journal*, **36**(24), 3573–3599.
- Yesbolatova, A., Saito, Y., Kitamoto, N., Makino-Itou, H., Ajima, R., Nakano, R., Nakaoka, H., Fukui, K., Gamo, K., Tominari, Y., Takeuchi, H., Saga, Y., Hayashi, K. ichiro, & Kanemaki, M. T. (2020). The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice. *Nature Communications 2020*, **11**(1), 1–13.
- Yingjun, X., Wen, T., Yujian, L., Lingling, X., Huimin, H., Qun, F., & Junhong, C. (2015). Microduplication of chromosome Xq25 encompassing STAG2 gene in a boy with intellectual disability. *European Journal of Medical Genetics*, **58**(2), 116–121.

- Yu, J., Schmidt, S., Botto, M., Lee, K., Ghent, C. M., Goodfried, J. M., Howe, A., O'Reilly, F. J., Morgan, D. O., & Boland, A. (2025). Substrate recognition by human separase. *Science Advances*, **11**(46), eady9807.
- Zhang, H., Shi, Z., Banigan, E. J., Kim, Y., Yu, H., Bai, X. chen, & Finkelstein, I. J. (2023). CTCF and R-loops are boundaries of cohesin-mediated DNA looping. *Molecular Cell*, **83**(16), 2856-2871.e8.
- Zhang, J., Shi, X., Li, Y., Kim, B. J., Jia, J., Huang, Z., Yang, T., Fu, X., Jung, S. Y., Wang, Y., Zhang, P., Kim, S. T., Pan, X., & Qin, J. (2008). Acetylation of Smc3 by Eco1 Is Required for S Phase Sister Chromatid Cohesion in Both Human and Yeast. *Molecular Cell*, **31**(1), 143–151.
- Zhang, N., Panigrahi, A. K., Mao, Q., & Pati, D. (2011). Interaction of Sororin Protein with Polo-like Kinase 1 Mediates Resolution of Chromosomal Arm Cohesion. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**(48), 41826.

謝辞

これまで指導してくださった西山朋子教授に感謝いたします。基本的な実験操作から細かい注意点、考察の方法まで幅広く指導していただきました。また、学部時代から今日に至るまで、自身の成長につながる様々な機会を与えていただきました。ここに感謝いたします。

木下慶美助教、吉田誠助教には実験上のアドバイスを多くいただきました。日々の研究室での生活面でも常にサポートしてくださったことをここに感謝いたします。また、研究員の原智幸さんには細胞実験において多くのアドバイスをいただきました。ここに感謝いたします。

スペイン癌研究センターの Ana Losada 教授、Daniel Giménez 研究員には Micro-C サンプルのシークエンシングと解析を行っていただき、本研究にクリティカルなデータをいただきました。ここに感謝いたします。

京都大学生命科学研究科の青木一洋教授、後藤祐平准教授には、FRAP 実験に用いる顕微鏡を使わせていただき、多大なご助力をいただきました。ここに感謝いたします。

京都大学アイセムスの杉山弘教授、日高久美さんには、高速 AFM による観察をしていただき、常にクオリティの高いデータをいただきました。ここに感謝いたします。

東京大学定量生命科学研究所の白髭克彦教授、坂田豊典助教には Micro-C 実験手法をご教授いただきました。ここに感謝いたします。

先輩である丹羽叶真さんには、申請論文において多大な貢献をしていただき、学部時代には多くのご助力をいただきました。ここに感謝いたします。

本研究室の技術補佐員である田原絵理さんには基本的な実験操作の多くを教えてくださいいただきました。また細胞の作製から培養、継代、実験に多くのご助力をいただきました。研究室での生活面においても常にサポートしてくださいました。同じく技術補佐員の下浦舞さん、青木真理さんには実験に用いる細胞の作製から培養、継代などにご尽力いただきました。ここに感謝いたします。

本研究室の事務補佐員である吉田しのぶさんには日々の研究室の生活面で多くのサポートをいただきました。ここに感謝いたします。

本研究室学生の方々には、実験、ディスカッション、研究室生活にいたるまで多くのご助力をいただきました。ここに感謝いたします。

最後に、いつも私を傍で支えてくれた家族とパートナーに感謝いたします。