

平野染色体ダイナミクス研究室  
Chromosome Dynamics Laboratory

主任研究員 平野 達也 (理博)  
HIRANO, Tatsuya (Ph.D.)



キーセンテンス：

1. 染色体構築と分離の謎を探る
2. コンデンシンとコヒーシンの分子メカニズムを探る
3. 染色体機能の異常を伴う遺伝疾患を理解する

キーワード：

染色体、姉妹染色分体、染色体分離、染色体構築、細胞周期、有糸分裂、減数分裂、コンデンシン、コヒーシン、SMC タンパク質

研究概要

染色体は、遺伝情報の継承と発現の場として働く構造体であり、あらゆる生命現象の根幹にあると言っても過言ではない。当研究室では、染色体の構築と分離に中心的な役割をもつ分子群、特にコンデンシンとコヒーシンとよばれるタンパク質複合体の解析を中心に、染色体ダイナミクスの総合的理解を目指している。多彩な実験材料（培養細胞・卵母細胞・カエル卵抽出液・バクテリア）と多角的なアプローチ（細胞生物学・生化学・構造生物学・ゲノム生物学・分子遺伝学）を組み合わせることにより、これらのタンパク質複合体の機能と制御を生体内・試験管内両面から追求するとともに、染色体構築の進化的基盤や染色体異常を伴うヒトの遺伝疾患についても解析を進めている。染色体の研究は、がん細胞の増殖機構や生殖細胞の形成を理解するための基盤を提供することから、基礎医学・臨床医学の諸分野にも大きな波及効果をもたらすことが期待される。

1. コンデンシンIIによるDNA複製と染色体凝縮の連係（小野、平野）

多くの真核細胞では、コンデンシンIとIIと呼ばれる2つのタンパク質複合体が染色体の構築に中心的な役割を果たしている。2つの複合体は、構造的によく似ているが、細胞周期の過程では互いに異なる制御を受けている。例えば、HeLa細胞を用いた解析によると、コンデンシンIが間期で細胞質に存在し、核膜崩壊後の染色体凝縮に関与するのに対して、コンデンシンIIは細胞周期を通じて核内に検出され、核膜崩壊以前の早い時期の凝縮に貢献する。加えて、コンデンシンIIは分裂期染色体のG-バンド領域（S期の遅い時期に複製される領域）に集中する傾向がみられる。こうした背景から、我々は、染色体の複製と凝縮という2つの事象がコンデンシンIIを介して機能的に連係しているのではないかという作業仮説を立て、その検証を進めてきた。その結果、コンデンシンIIは（分裂期に先立って）S期の間から染色体との結合を開始していることが分かった。また、コンデンシンIIノックダウン細胞において、複製を弱く攪乱すると、中期染色体の形態に極めて大きな異常が観察された。これらの結果は、コンデンシンIIが複製直後の染色体領域を適切に構造変換させるためにS期の間から機能している可能性を示唆する。この可能性を検証するために、現在、FISH (fluorescence in-situ hybridization) 法を用いてS期における染色体の動態解析を進めている。

2. 小頭症の原因タンパク質MCPH1によるコンデンシンII複合体の制御（山下、平野）

MCPH1は小頭症（microcephaly）の原因タンパク質の一つであり、このタンパク質に変異を持つ患者由来の細胞では、分裂期に先立つG2期において時期尚早な染色体凝縮が観察される。我々はこれまでに、この現象がコンデンシンII複合体の制御異常に起因することを明らかにし、MCPH1がコンデンシンIIの抑制因子として働く可能性を示唆した。本年度の研究において、我々は、カエル卵抽出液を利用して、この可能性を検証するための無細胞系を確立することに成功した。ヒトMCPH1を添加すると、抽出液中に存在するコンデンシンIIの染色体結合が特異的に阻害されることを見いだした。さらに、欠変異体を用いることにより、阻害活性を担うのはMCPH1のN末端領域であることがわかった。興味深いことに、この領域に小頭症の病因となるミスセンス変異を導入すると、コンデンシンIIの阻害活性は著しく損なわれた。さらにMCPH1のN末端領域を患者細胞で発現させると、G2期に観察される染色体凝縮異常は解消された。これらの結果から、MCPH1はコンデンシンIIの活性を直接的に制御することにより、G2期における時期尚早な染色体凝縮を抑制していることが示唆された。

### 3. コンデンシンとコヒーシンの協調による染色体構築メカニズム（新富，平野）

分裂期における染色体構築は遺伝情報の正確な分配に必須のプロセスである。興味深いことに、分裂中期の染色体は、生物種や発生・分化段階の違いに応じて特徴的な形状を示すことが知られている。我々は、染色体が形作られるメカニズムを理解するために、カエル卵抽出液においてコンデンシン（および ）やコヒーシンの存在量や作用タイミングを操作する方法を確立した。コンデンシン と の存在比を本来の5対1からヒト培養細胞で見られる1対1へと操作すると、染色体の形状が初期胚に特徴的な細く長いものから体細胞型の太く短いものへと変化した。コヒーシンは、その大半が分裂前期に染色体から解離することによってコンデンシン の染色体軸への集積を促す一方で、中期染色体上に残ったものはコンデンシン と協調して姉妹染色分体の並列性の維持に貢献することが明らかになった。さらに、2つのコンデンシンの作用タイミングが染色体のそれぞれの個別化に影響を与えることも示された。これらの結果より、染色体の形状は、その長軸方向と横方向の凝縮や、姉妹染色分体の接着と分割をもたらす力のバランスによって決定されると考えられた。

### 4. 組換えサブユニットから再構成したコンデンシン複合体の生化学的解析（木下，平野）

真核生物のコンデンシン複合体は、ATP結合モチーフを持つ2種のSMC (structural maintenance of chromosomes)コアサブユニットと、3種のnon-SMC制御サブユニットから成り立っている。SMCサブユニットはコンデンシン と に共通しているが、non-SMCサブユニットはそれぞれの複合体に特有である。2つのコンデンシン複合体がいかにして分裂期染色体の構築を担っているのか、その分子機構についての理解はいまだに乏しい。我々は、組換えサブユニットを用いた生化学的解析を可能にする目的で、哺乳類コンデンシン複合体の発現・精製系の構築を試み、（少なくとも一つについて）活性型の組換え複合体を再構成することに成功した。今後、個々のnon-SMCサブユニットがいかにしてSMC ATPaseサイクルを制御しているのか、コンデンシンIとIIの分子活性にどのような違いがあるのか、等コンデンシンの分子機構の本質に迫るための解析を進める予定である。

### 5. 枯草菌コンデンシンの構造生物学・分子遺伝学的解析（鎌田，平野）

大変興味深いことに、多くのバクテリアにおいても、コンデンシンに相当する複合体が存在し、染色体の構築と分離に関与している。バクテリア型のコンデンシンは、単一のSMCサブユニットと2種のnon-SMCサブユニット（ScpAとScpB）から構成される。我々は、それぞれのnon-SMCサブユニットがどのような構造的基盤を介してSMCサブユニットの活性を制御しているのかを明らかにするため、枯草菌（*Bacillus subtilis*）のコンデンシン複合体をモデル系として解析を行っている。本年度は、これまでの生化学的解析でわかった機能ドメイン領域やそれらの変異体を枯草菌内で過剰に発現させる系を確立し、non-SMCサブユニットの生体内機能を解析した。*ScpA*と*ScpB*の遺伝子は一つのオペロンとして発現され、いずれの破壊株も*smc*破壊株と同様に高温致死の表現型を示す。この特性を利用し、まず内在性の*scpA*と*scpB*の発現量をIPTGの添加で操作可能な株を作成し、それをもとに各サブユニット変異体を誘導可能な株を構築した。これらの株の生育を指標に解析を進めた結果、ふたつのnon-SMCサブユニットがSMCタンパク質の機能を促進するように働くことがわかった。今後さらに、個々の機能ドメインについて、詳細な解析を進めていく予定である。

### 6. 哺乳類減数分裂における新規コヒーシンサブユニットRAD21Lの解析（李，平野）

減数分裂では、体細胞分裂と異なり、1回のDNA複製後に2回の分裂が連続して起こる。とりわけ減数第一分裂では染色体は特有な挙動を示す。すなわち、相同染色体が対合・組み換えを起こす結果、減数第一分裂中期には二価染色体が形成され、後期には(姉妹染色分体ではなく)相同染色体が分離する。体細胞分裂において姉妹染色分体の接着を制御するコヒーシン複合体は、減数分裂期にはいくつかの特異的なサブユニットが発現することにより、その特徴的な染色体動態に寄与する。我々は、最近、脊椎動物において保存されている新規の減数分裂特異的コヒーシンサブユニットRAD21L (RAD21-like protein) を発見した。マウスにおいて解析したところ、RAD21Lは、SMC3とSTAG3に加え、SMC1 $\alpha$ あるいはSMC1 $\beta$ のどちらか一方と複合体を形成することが分かった。また、興味深いことに、RAD21Lは、既知の減数分裂特異的コヒーシンサブユニットとは異なり、減数分裂前期にだけ特異的に発現し、レプトテネ期からパキテネ期の中頃までシナプトネマ構造に局在するが、その後消失する。これらの結果から、RAD21Lを含むコヒーシン複合体は、姉妹染色分体の接着よりもむしろ、相同染色体の対合や組換えに関与している可能性が示唆された。

### 7. 哺乳類の受精卵におけるコンデンシンの制御（西出，平野）

受精卵には両親の配偶子に由来する雄性前核と雌性前核が存在する。雌雄前核内のクロマチンは、エピジェネティック修飾の状態が互いに異なっており、細胞周期の進行とともに修飾状態が変化することが知られている。我々は、こうしたエピジェネティック修飾の変化がコンデンシン と の局在や機能の制御に影響を与えているのではないかという仮説を立て、検証を進めている。本年度は、まず、マウス受精卵を研究材料として、コンデンシン と の時空間的動態を明らかにすることを目標とした。体外培養した受精卵を用いて、コンデンシン I あるいは II 特異的なサブユニットに対する抗体を使用して免疫染色を行った。その結果、雌雄前核ではコンデンシン と の細胞内局在が互いに異なること、細胞周期の進行とともにその局在が変化することを明らかにした。今後は、雌雄前核におけるクロマチンのエピジェネティック修飾とコンデンシンの動態との関係に焦点を当て、解析を進める予定である。

#### 8. 単細胞紅藻をモデル系としたコンデンシンの染色体結合領域の同定 (藤原、平野)

多くの真核細胞では、コンデンシン と と呼ばれる2つのタンパク質複合体が染色体の構築に中心的な役割を果たしている。しかし、2つの複合体がゲノムのどの領域に結合してそれぞれに特有の機能を果たしているのかという問題についての知見は極めて乏しい。本研究の目的は、コンデンシン と が結合するゲノム領域を同定し、得られた情報をもとに分裂期染色体の構築機構を解明することである。この目的を達成するため、我々はコンデンシン と を有する原始的な単細胞紅藻である *Cyanidioschyzon merolae* (以下シゾンと略す) に着目した。サイズが小さく、冗長性が低いシゾンのゲノムは、網羅的な解析に適している。本年度は、シゾンのコンデンシン と を特異的に認識する抗体を作製した。現在、免疫染色によって細胞周期における2つのコンデンシンの局在の解析を行うと同時に、ChIPシーケンス法による染色体結合領域の同定に向けて研究を進めている。

#### ----- Key Sentences:

1. To unlock the secret of chromosome architecture and segregation
2. To elucidate the molecular mechanisms of condensin and cohesin
3. To understand the molecular basis of human diseases accompanying chromosomal defects

#### Key Words:

chromosomes, sister chromatids, chromosome segregation, chromosome condensation, cell cycle, mitosis, meiosis, condensin, cohesin, SMC proteins

#### Outline

The long-term goal in this laboratory is to understand the molecular mechanisms of chromosome assembly and segregation during mitosis and meiosis. Central to this process are two multiprotein complexes, known as condensins and cohesin, that regulate chromosome condensation and cohesion, respectively. The two complexes are structurally related with each other and contain members of a large family of chromosomal ATPases, known as SMC (structural maintenance of chromosomes) proteins. Mutations in the subunits of condensin and cohesin cause various defects in chromosome segregation, leading to genome instability in many model organisms. Furthermore, emerging lines of evidence suggest that functional perturbation of condensin and cohesin is tightly associated with several developmental diseases in humans. Our laboratory takes multidisciplinary approaches to understanding how condensin, cohesin and SMC proteins might work at a mechanistic level both in vivo and in vitro.

#### 1. Functional link between DNA replication and chromosome condensation mediated by condensin II (Ono, Hirano)

Eukaryotic cells possess two different condensin complexes, known as condensin I and II. The two complexes play essential yet distinct functions in the processes of mitotic chromosome assembly and segregation. In HeLa cells, for example, condensin I is sequestered into the cytoplasm from interphase through prophase and gains access to chromosomes only after the nuclear envelope breaks down in prometaphase. In contrast, condensin II is predominantly nuclear during interphase and contributes to early stages of chromosome assembly in prophase. In metaphase chromosomes, condensin II tends to be enriched in G-band regions, in which DNA is replicated late in preceding S phase. This set of information has allowed us to propose the working hypothesis that

condensin II may play a role in linking DNA replication in S phase to chromosome condensation in M phase. Quantitative immunolabeling analyses show that condensin II starts to associate with chromosomes during S phase. Interestingly, when weak replicative stress is applied to condensin II-knockdown cells, very severe defects in chromosome morphology are observed in M phase. These results suggest that condensin II may play a crucial role in structural changes of replicated chromosomes during S phase and that this process may be a prerequisite to proper assembly of chromosomes in subsequent M phase. We now plan to use FISH (fluorescence in-situ hybridization) to further explore this idea.

## **2. Regulation of condensin II by MCPH1, a gene product whose mutations cause primary microcephaly in humans (Yamashita, Hirano)**

Primary microcephaly is a neurodevelopmental disorder characterized by marked reduction in brain size and mental retardation in humans. Cells from patients carrying mutations in *MCPH1* gene, one of the genes responsible for microcephaly, display a unique cellular phenotype accompanying premature chromosome condensation (PCC) in early G2 phase. Our previous study showed that this phenotype is caused by misregulation of condensin II, but not of condensin I. To test the possibility that MCPH1 might directly regulate condensin II, we have developed a cell-free assay using *Xenopus* egg extracts. Our results using a series of truncation mutants show that an N-terminal domain of human MCPH1 blocks chromosomal loading of condensin II in a highly specific manner *in vitro*. Such an inhibitory activity is greatly reduced when point mutations identified in MCPH1 patients are introduced. To understand to what extent the results obtained from the cell-free assay might be relevant to the *in vivo* function of MCPH1, we have performed a complementation assay using patient cells. We find that the N-terminal domain is sufficient to rescue the PCC phenotype, suggesting that MCPH1 suppresses the untimely chromosome condensation in G2 phase by directly regulating the action of condensin II.

## **3. Chromosome shaping by balancing actions of condensins and cohesin (Shintomi, Hirano)**

Proper assembly of metaphase chromosomes is essential for faithful segregation of sister chromatids in anaphase. The shape of chromosomes is known to vary widely among different organisms or different developmental stages. To understand how various shapes of chromosomes might be determined by concerted actions of potential regulators such as condensin I, II, and cohesin, we have devised a series of sophisticated protocols in which their levels or temporal order of actions can be manipulated in *Xenopus* egg extracts. When the relative ratio of condensin I to II is forced to be smaller, embryonic chromosomes become shorter and thicker, being reminiscent of somatic chromosomes. Release of bulk cohesin from chromosome arms promotes accumulation of condensin II on chromatid axes whereas residual cohesin collaborates with condensin I to properly juxtapose a pair of sister chromatids. Evidence is also provided that individualization of chromosomes requires timely actions of condensin I and II. These results demonstrate that chromosome shaping is achieved by exquisite balance between lateral compaction and axial shortening of each chromatid and between cohesion and resolution of sister chromatids.

## **4. Biochemical analysis of condensins using reconstituted complexes in vitro (Kinoshita, Hirano)**

Many eukaryotic cells have two different condensin complexes (known as condensin I and II) that play a key role in the process of mitotic chromosome condensation. The two condensin complexes share a heterodimeric pair of SMC ATPases as their core subunits, whereas each complex contains a distinct set of three non-SMC regulatory subunits. Despite recent progress in our understanding of cellular functions and regulation of condensins, their molecular mechanisms of action remain to be fully investigated. To this end, we have developed an experimental system to express, purify and reconstitute recombinant condensin complexes *in vitro*. At least one of the reconstituted holocomplexes is active enough to induce mitotic chromosome assembly when it is added back into frog cell-free extracts. By using these recombinant proteins as powerful tools, we now plan to examine how the SMC ATPase cycle might be modulated by individual non-SMC subunits and how the mechanochemical cycle of condensins might contribute to dynamic conformational change of chromosomes during mitosis.

## **5. Structural and genetic analyses of the bacterial condensin complex (Kamada, Hirano)**

It is remarkable to find that a condensin-like complex exists in many if not all eubacterial species

and contributes to chromosome organization and segregation. In *Bacillus subtilis*, the “condensin” complex is composed of an SMC homodimer with two kinds of non-SMC subunits (known as ScpA and ScpB). We use this relatively simple complex as a model system to understand the structural basis of action of condensin complexes. During the past year, we have established a set of molecular genetic tools to complement our previous structural data. The *scpA* and *scpB* genes are expressed from a single operon, and disruption of either gene causes temperature-sensitive lethality as seen in an *smc* disruptant. We first construct strains in which the endogenous levels of gene expression can be controlled by an inducible promoter. Mutant versions of *scpA* and/or *scpB* are expressed in these strains and the viability of the resulting strains is assessed. Our results show that ScpA and ScpB promote SMC functions in vivo. Further analysis is now in progress to understand functions of individual domains of each subunit.

#### **6. A novel cohesin subunit, RAD21L, in mammalian meiosis (Lee, Hirano)**

Meiosis is different from mitosis in that two successive divisions occur after a single round of DNA replication. In meiosis I, chromosome behavior is especially unique: homologous chromosomes pair and recombine with each other, making bivalent chromosomes at metaphase I. At anaphase I, homologous chromosomes, but not sister chromatids, separate from each other. A multi-subunit protein complex called cohesin regulates sister chromatid cohesion in mitosis. In meiosis, some specific subunits are expressed and contribute to the unique chromosome dynamics. Recently, we have identified a novel cohesin subunit, RAD21L (RAD21-like protein), which is conserved among vertebrates. In mice, RAD21L make protein complexes with SMC3, STAG3, and either SMC1a or SMC1b. Interestingly, unlike other meiotic cohesin subunits, RAD21L is expressed only in meiotic prophase I: it localizes along axial/lateral elements of the synaptonemal complex from leptotene to mid pachytene, but is not detected in later stages. From these results, we propose that cohesin complex containing RAD21L may be involved in synapsis and/or recombination between homologous chromosomes rather than sister chromatid cohesion.

#### **7. Regulation of condensins in mammalian fertilized eggs (Nishide, Hirano)**

Fertilized eggs bear male and female pronuclei, which are originated from paternal and maternal gametes, respectively. It is known that the patterns of epigenetic modifications are different between male and female pronuclei and that they change during cell cycle progression. We hypothesize that differential epigenetic modifications might affect or control the function and localization of condensin I and II in each pronucleus. To test this hypothesis, we have first investigated the spatio-temporal dynamics of the two condensin complexes in fertilized mouse eggs. By labeling fertilized eggs cultured in vitro with antibodies against condensin I- or II-specific subunits, we find that the two complexes have distinct subcellular localizations between male and female pronuclei and that their localization change during cell cycle progression. We now plan to explore the functional relationship, if any, between epigenetic modifications and condensins' dynamics during early development.

#### **8. Identification of chromosomal binding regions of condensin I and II in a red alga (Fujiwara, Hirano)**

Condensin I and II play a central role in chromosome assembly and segregation in vertebrate cells. It remains poorly understood, however, what factor(s) might determine the distributions of the two condensin complexes along chromosomes, and how such distributions might contribute to large-scale conformational changes of chromosomes during mitosis. To address these questions, we are using the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* as a model organism. While the genome of *C. merolae* is very small, being comparable with that of budding yeast, it encodes all subunits of both condensin I and II (note that budding yeast has only condensin I). Moreover, the *C. merolae* genome contains a minimal set of repetitive sequences, making it an ideal material to identify chromosomal binding regions of the two condensin complexes. During the past year, we have successfully generated antibodies against subunits specific to condensin I and II. We now plan to examine the cell cycle-dependent localization of condensin I and II by immunofluorescence microscopy, and to establish the methodology of chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) analysis in this organism.

***Principal Investigator***

平野 達也      Tatsuya Hirano

***Staff Scientists***

小野 教夫      Takao Ono

鎌田 勝彦      Katsuhiko Kamada

木下 和久      Kazuhisa Kinoshita

***Postdoctoral Fellows***

李 智博      Jibak Lee

新富 圭史      Keishi Shintomi

山下 大輔      Daisuke Yamashita

西出 賢次      Kenji Nishide

藤原 崇之      Takayuki Fujiwara

***Technical Staff***

松浦 明子      Akiko Matsuura

***Assistant***

有光 いずみ      Izumi Arimitsu

***Part-timer***

小林 奈保美      Naomi Kobayashi