

平野染色体ダイナミクス研究室

主任研究員 平野 達也 (理博)



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・紅藻細胞・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複製と染色体構築の機能的な関係（小野、平野）

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は、分裂期染色体の構築に中心的な役割を果たしている。このうちコンデンシンIIは細胞周期を通じて核に局在し、コンデンシンIに先だって分裂前期から染色体凝縮に貢献する。我々はこれまでに、コンデンシンIIがS期から染色体への結合を開始することを見いだしていたが、DNA複製そのものへの関与は認められず、この時期におけるコンデンシンIIの役割は不明であった。そこで今年度、我々は間期核クロマチンを強制的に分裂期染色体様の構造に変換するPCC (premature chromosome condensation) 法を改良し、複製前後における染色体形態の変化を可視化することを試みた。複製後期のPCC誘導細胞では、コンデンシンIIは複製を終えた領域のみに見いだされ、2本の染色分体の軸上に局在していた。一方、コンデンシンIIを除去した細胞においてPCCを誘導すると、複製後期に観察される姉妹染色体の分割が大きく抑制された。次に、FISH (fluorescence in-situ hybridization) 解析を行い、コンデンシンIIが複製したDNAをS期のうちに分離させていることを確認した。ごく弱く複製を攪乱すると、S期における姉妹染色分体の分割は部分的に抑制され、その条件下でさらにコンデンシンIIを除くと分裂期に入ってから姉妹染色分体の凝縮と分離が大きく損なわれることが分かった。これらの結果は、コンデンシンIIはS期から姉妹染色分体の分割を開始し、分裂期染色体の凝縮と分離の準備を進めていることを示唆する。

2. 大脳皮質発生におけるコンデンシンIとIIの機能解析（西出、平野）

多くの真核生物には、コンデンシンIとコンデンシンIIと呼ばれる2つの異なるコンデンシン複合体が存在し、分裂期には協調しつつも異なる役割を担う。最近になって、小頭症（大脳皮質の矮小化を伴うヒト遺伝疾患）の原因タンパク質MCPH1がコンデンシンIIの負の制御因子として働いていることが示された。しかし一方で、大脳皮質の発生過程においてコンデンシンIとIIがどのように発現しているのか、発現しているならば両者はどのような固有の機能を持っているのか、という問題の理解は進んでいない。我々はこれまでに、胎生中期から後期のマウスの大脳皮質において、コンデンシンIとIIは神経幹細胞に共に発現していることを見出した。本年度は、神経幹細胞におけるコンデンシンの役割を明らかにするために、2つのコンデンシン複合体の共通サブユニットであるSMC2の条件的ノックアウトマウスを作製した。このサブユニットを胎生中期の神経幹細胞から除去したところ、分裂期染色体の構築と分配に大きな異常が生じ、最終的には細胞死に至ることが分かった。したがって、コンデンシンIとII（あるいはいずれか一方）は神経幹細胞の増殖に必須であると考えられる。今後は、神経幹細胞に

においてコンデンシン I または II を特異的に除去したマウスを作製し、それぞれのコンデンシンが脳皮質発生に果たす役割を明らかにする予定である。

3. 単細胞紅藻をモデル系としたコンデンシン I と II の解析 (藤原、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。しかし、2 つのコンデンシンの間にはどのような機能の差異があるのか、また、それぞれの機能がいかんして染色体の構築に寄与しているのか、という本質的な問題についての理解はいまだに乏しい。この問題を進化的な視点から理解する目的で、我々は単細胞性の紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (以下シズンと略す) に着目した。シズンは、2 つのコンデンシンを有する最も単純な真核生物であることから、コンデンシンが有する最も根源的な機能を理解するための有力なモデル系になると考えられた。細胞周期を通じた解析の結果、シズンのコンデンシン II は S 期から核内に存在する一方、コンデンシン I は中期から終期にかけて染色体全体に局在することが分かった。こうした 2 つのコンデンシンの動態は、動物細胞における観察と驚くべきほど共通していたが、シズンでは中期までにコンデンシン II がセントロメア付近に集中してくることが特徴的であった。現在、コンデンシン II の欠損株を作製し、コンデンシン II が除去された時のセントロメアの動態に着目して機能解析を行っている。このようにシズンをモデルとした解析から、真核生物の染色体構築と分離過程の普遍的な仕組みとその進化を理解していきたい。

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 I と II 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ん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、活性型の組換え複合体の再構成に成功している。さらに特定の non-SMC 制御サブユニットを欠失させたサブ複合体、および SMC コアサブユニットの ATP 結合モチーフに変異を導入した ATPase 変異型ホロ複合体を用いた解析から、コンデンシン複合体の機能発現における各 non-SMC サブユニットの貢献と ATP 結合・加水分解サイクルの役割が明らかになりつつある。今後、各種複合体の個々のふるまいをより詳細に追跡できるタグ標識型組換え複合体の解析を進めることによって、染色体構築におけるコンデンシンの分子活性の本質を明らかにしたい。

5. 精製標品を用いた分裂期染色体の再構成 (新富、平野)

染色体凝縮は細胞分裂に伴う遺伝情報の継承に不可欠なプロセスである。コンデンシン I や II 型 DNA トポイソメラーゼ (トポ II) は主要な染色体結合タンパク質であり、いずれも染色体凝縮に必須であることが示されている。また、コアヒストンは染色体の基本構造単位であるヌクレオソームを形成することによって、凝縮に貢献していると考えられる。しかし、従来の解析法ではコアヒストンに実験的操作を施すことが難しいため、コアヒストンが染色体凝縮に果たす役割は十分に検討されてこなかった。こうした問題を解決するには、可能な限り少ない種類の精製タンパク質を用いて染色体を試験管内に再構成することが有力なアプローチになると考えられた。我々は、様々な条件を検索した結果、コアヒストン、トポ II、コンデンシン I の精製標品のみを使って、染色体「様」構造を作ることに成功した。こうした構造の再構成には、コアヒストンからテイル領域を欠失させることが不可欠であったため、ヌクレオソーム間の物理的相互作用が染色体凝縮に重要な役割を果たす可能性が示唆された。現在、DNA が染色体内でどのように折り畳まれるのかという本質的な問題への追究も視野に入れて、コアヒストンのバリエーションや変異体を用いるなど再構成系の改良を進めている。

6. バクテリア型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、SMC 様蛋白質が存在し核様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、ホモ 2 量体 SMC と 2 種の制御サブユニット (SepA と SepB) から構成される。我々は、これらの制御サブユニットがどのような構造的基盤を通して 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、中度好熱菌由来の組換えタンパク質を用いて解析を進めてきた。その結果、SMC サブユニットの ATP 加水分解反応を担う領域 (ヘッドドメイン) の会合は、制御サブユニットの内部構造変化に応じて制御されていることが推測された。今年度は、2 種の制御サブユニット結合した SMC 複合体を精製し、電子顕微鏡観察を行うことで、この複合体分子を

俯瞰的に調査することを試みた。その過程で、ScpAとScpBの制御サブユニットはSMCのV字状末端に存在するヘッドドメインの一方にしか結合しておらず、SMC-ScpA-ScpB複合体の量比が2:1:2であることがわかった。この非対称な構造は、SMCのATP加水分解能を欠失させた各種の変異体でも観察されることから、SMC複合体の機能を理解するうえで本質的な構造であると考えられた。

Chromosome Dynamics Laboratory

HIRANO, Tatsuya (Ph.D.)
Chief Scientist



Key Sentences:

1. To unlock the secret of chromosome architecture and segregation
2. To elucidate the molecular mechanisms of condensins 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 condensins and cohesin is tightly associated with several developmental diseases in humans. Our laboratory takes multidisciplinary approaches to understanding how condensins, cohesin and SMC proteins might work at a mechanistic level both in vivo and in vitro.

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

Condensins I and II play essential yet distinct functions in chromosome condensation and segregation in mitosis. Unlike condensin I, condensin II localizes to the nucleus during interphase and contributes to early stages of chromosome assembly in prophase. Although our previous data had shown that condensin II starts to associate with chromosomes during S phase, it remained unclear what functions condensin II might have before mitotic entry. To address this question, we have established advanced PCC (premature chromosome condensation) assays by which cryptic structural changes of chromosomes during S phase could be uncovered. We found that condensin II forms “sister axes” in replicated regions of S-PCC products, and that such PCC-driven sister chromatid resolution is greatly compromised in cells depleted of condensin II. Furthermore, FISH (fluorescence in-situ hybridization) assays revealed that condensin II promotes disjoining of duplicated chromosomal loci during S phase. Application of mild replicative stress partially impaired this process and further exacerbated phenotypes arising from condensin II depletion. These results suggest that condensin II initiates sister chromatid resolution during S phase to prepares for subsequent chromosome condensation and segregation in mitosis.

2. Functional analysis of condensins I and II in the developing cerebral cortex (Nishide, Hirano)

Most eukaryotes have two different condensin complexes (known as condensins I and II). It has recently been reported that condensin II activity is negatively regulated by MCPH1, a protein whose mutations cause marked reduction of cerebral cortices in humans and mice (i. e., microcephaly). Very little is known, however, about the dynamics and functions of condensins I and II during cortical development. Our previous immunofluorescence analysis had shown that subunits of both condensins I and II are expressed in neural stem cells (NSCs) at mid and late embryonic stages. During the past year, we have generated conditional knockout mice in which SMC2, a common subunit of condensins I and II, could be depleted from NSCs at mid embryonic stage. We found that NSCs depleted of SMC2 display massive defects in mitotic chromosome architecture and segregation, eventually undergoing apoptotic cell death after cytokinesis. We now

plan to conditionally knockout specific subunits of condensins I and II and to test whether the two complexes might have non-overlapping functions during cortical development.

3. Cell cycle regulation of condensins I and II in a unicellular red alga (Fujiwara, Hirano)

Condensins I and II play a central role in chromosome assembly and segregation in vertebrate cells. It remains poorly understood, however, whether the two complexes might have distinct functions, or how such functions might contribute to progressive conformational changes of chromosomes during mitosis. To address these questions from an evolutionary point of view, we are using the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* as a model organism. *C. merolae* is the simplest organism that possesses both condensins I and II. During the past year, we have demonstrated that condensin II localizes to the nucleus during S phase and becomes concentrated on centromeres by metaphase. In contrast, condensin I distributed more broadly along the arms in metaphase. Although the order of actions of the two condensin complexes in *C. merolae* was strikingly similar to that observed in vertebrate cells, mitotic enrichment of condensin II at centromeres was rather unique to this organisms. We are now generating condensin II-knockout strains to test its functions in *C. merolae*. It is anticipated that the current study using the emerging model organism will greatly contribute to our understanding of the evolution of the chromosome condensation machinery.

4. Reconstitution and biochemical analysis of recombinant condensin complexes in vitro (Kinoshita, Hirano)

Many eukaryotic cells have two different condensin complexes (known as condensins 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 elucidated. To this end, we have developed an experimental system for expressing and reconstituting condensins I and II from recombinant subunits, and succeeded in purifying functionally active complexes with high purity and high yields. We also prepared a panel of mutant complexes (i.e., sub-complexes lacking one or more of the regulatory subunits or holo-complexes mutated in their SMC ATPase domains), and used them to address specific contributions of each non-SMC subunit and the SMC ATPase cycle to condensin functions. We plan to extend the current analysis by using fluorescently tagged versions of the recombinant complexes and to track more detailed behaviors of each condensin complex in the process of chromosome condensation in mitosis.

5. Reconstitution of a mitotic chromosome from purified components (Shintomi, Hirano)

Chromosome condensation is essential for accurate transmission of genomic information during mitosis. This process requires two major chromosomal proteins, condensin I and type II DNA topoisomerase (topo II). Although core histones are also likely to contribute to the process of condensation, no direct evidence for this idea has been available until now. This is because conventional assays did not enable us to precisely manipulate the chromosome-associated fractions of core histones. To overcome this technical limitation, we have aimed to establish an experimental system in which a mitotic chromosome is reconstituted from as few purified components as possible in a test tube. Extensive survey of assay conditions allowed us to assemble 'chromosome-like' structures starting from only core histones, topo II, and condensin I. Remarkably, it turned out that successful assembly of such structures depends on removal of tail regions of histone H3-H4 that are implicated in nucleosome-nucleosome interactions. Future refinement and modification of this reconstitution assays will undoubtedly help us solve one of the biology's most fascinating questions of how DNA is folded within a chromosome.

6. Structural and genetic analyses of the bacterial condensin complex (Kamada, Hirano)

In most prokaryotes as well as eukaryotes, condensins play an essential role in the organization and segregation of nucleoids. The prokaryotic condensin complex is composed of an SMC homodimer and two auxiliary subunits known as ScpA and ScpB. To understand the structural basis of action of these subunits, we are using recombinant proteins derived from a thermophilous bacterium. Our previous data had suggested that the ScpAB subcomplex exhibits internal structural changes, thereby regulating engagement of the SMC head domain that is responsible for

ATP hydrolysis. During the past year, we have used a full complex of SMC-ScpAB and investigated its mode of action by electron microscopy. The complex displayed an asymmetric configuration in which the ScpAB subcomplex is associated with only one end of the V-shaped SMC homodimer. This configuration was consistent with evidence that the stoichiometry of SMC:ScpA:ScpB is 2:1:2. Mutant complexes containing ATPase-deficient SMC subunits also displayed similar structures, suggesting that the asymmetric orientation of the auxiliary modulate represents the fundamental architecture of the SMC-ScpAB complex.

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
新富 圭史 Keishi Shintomi

Postdoctoral Fellows

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

樽谷 愛理 Airi Tarutani
小林 奈保美 Naomi Kobayashi