

今本細胞核機能研究室
Cellular Dynamics Laboratory



主任研究員 今本 尚子 (医博)
IMAMOTO, Naoko (Ph.D)

キーセンテンス：

1. 核-細胞質間分子流通システムの解析
2. 細胞核の機能的構造構築の理解
3. ゲノムの複製と分配の解析

キーワード：

細胞核、核膜、核膜孔複合体、核-細胞質間輸送、染色体、細胞周期

研究目的

細胞核は高等真核生物の巨大なゲノムを安定に保持する一方で、同じゲノム情報から機能の異なる分化細胞をつくりだす仕組みを兼ね備えた動的な細胞内器官である。当研究室では、細胞核の機能制御の要となる核と細胞質の間の情報交換の仕組み、細胞核の機能を支える細胞核構築の仕組み、並びにゲノムを次世代に正確に継承するための分子装置の解析を通して、細胞核の機能と構造の関係を明らかにしようとしている。関与因子群とメカニズムの解析から、これらの個々の素過程が独立した現象ではなく、互いに連携していることがわかってくる。細胞レベルで得られた基礎的研究が生み出す知見を、癌や遺伝病などのヒト疾患や、分化・発生のようなより高次レベルの生命現象の理解へと結びつけることを目標としている。

1. 核-細胞質間分子流通システムの解析 (小瀬、木村、横山、田原、高木、今本)

1-a 分子シャペロン heat shock cognate 70 (Hsc70)の核内移行機構解析

核-細胞質間の能動的タンパク質輸送は、運搬体分子群 importin β ファミリーが RanGTPase システムと巧妙に共役することで行われている。近年、細胞外刺激や環境変化に应答して、細胞内輸送システムそのものが変化し、効率の良い細胞機能発現に寄与していることが明らかになってきた。

当研究室でも、熱ショック時では、正常時と異なり、塩基性アミノ酸に富む核局在化シグナル(NLS) 依存的核内輸送反応が強く抑制されることを明らかにしている。この核内輸送阻害の原因として、熱ショック時には、NLS 受容体である importin α が核に集積し、核から細胞質へのリサイクリングが強く阻害されていることを明らかにした (Furuta et al., Genes Cells 2004, Kose et al., J. Cell Biol., 2005)。しかし、このように塩基性 NLS 依存的核内移行が阻害される条件下で、分子シャペロン Hsc70 などは、熱ショックなどのストレスに应答し、速やかに細胞質から核に移行する。Hsc70 がどのような分子メカニズムで核内に移行するのか、その詳細は明らかになっていない。当研究室では、Hsc70 の熱ショック应答による核内移行を解析する *in vitro* 系を構築し、Hsc70 の核内輸送機構の解析を行ってきた。

importin β ファミリー分子群を吸収した細胞抽出液に、各 importin β ファミリー分子のリコンビナントタンパク質を再添加することで、*in vitro* 輸送系における Hsc70 の核内輸送経路を解析した。しかし、どのリコンビナント importin β ファミリータンパク質も Hsc70 の核内移行を促進しなかった。そこで本年度は、熱ショック処理をした HeLa 細胞から細胞抽出液を調整し、Hsc70 の核内移行を促進する活性を指標に、細胞抽出液を分離精製した。その結果、importin β ファミリーに属さない機能未知なタンパク質を同定した。この分子は、*in vitro* 解析系において、Hsc70 核内移行を強く促進した。現在、この分子の Hsc70 核内移行における機能を詳細に解析中である。

1-b importin β ファミリー運搬体分子群による核-細胞質間輸送の分担機構の解析

遺伝子機能の場である細胞核が、タンパク質合成の場である細胞質から隔てられた真核生物において、核と細胞質の間の情報分子の交換は、細胞の生命活動において必要不可欠である。タンパク質は核膜にある核膜孔複合体を通過する。核膜孔複合体は選択的なバリア機能をもつ疎水性の柔軟な構造で満たされており、ここに進入する性質をもつ分子のみが通過できると考えられている。核へ出入りするタンパク質は

数千種と見積もられるが、その多くは独力では核膜孔を通過できない。importin β ファミリーは核膜孔通過能と多様なタンパク質分子との結合能を合わせもち、タンパク質の核膜孔通過を介助する核輸送因子である。ヒトでは 21 種類の importin が知られ、これが数千種のタンパク質の核内外輸送を分担している。importin β ファミリーはそれぞれ輸送に関連する速度論的特性が異なる可能性が高く、多種類の importin β はその特性の違いに基づき、核内の諸反応に関わる特定のタンパク質グループを適時供給・除去するための輸送システムを構成していると予想される。この、核-細胞質間輸送システムの全体像を理解し、それを基盤として核内反応機構の研究を発展させるため、我々は未だ情報の少ない各 importin β とそれらの輸送基質の対応関係を網羅的に決定する方法の開発を進めている。その基本原理は、安定同位体標識(SILAC)した培養細胞抽出液中のタンパク質の核内輸送再構成系と、そこで核移行した標識タンパク質の質量分析法による同定である。この輸送系は、核膜構造を維持したまま細胞膜に透過性をもたせたセミインタクト細胞、importin β ファミリーを除去した細胞抽出液、1種類の組換え importin β タンパク質(必要に応じ importin α も)で構成される。この系において組換え輸送基質を用いた検討により、核内輸送反応の最適条件、反応後の核内タンパク質の抽出方法を設定した後、実際に安定同位体標識した細胞抽出液を用いて反応させた。質量分析法(LC-MS/MS および MALDI-MS/MS)で回収した核内タンパク質を同定する予備実験を行った。セミインタクト細胞に内在するタンパク質由来の大多数の非標識ペプチドと同時に、核内に輸送されたタンパク質由来の同位体標識ペプチドが同定されることが期待される。予備実験では importin β (および α)依存的に核内輸送された標識ペプチドが少数ながら実際に同定され、本方法の実効性が確認された。現在、標識ペプチドの同定数、また、最終的な基質同定数を推定する指標となるセミインタクト細胞由来ペプチドの同定総数を増加させるべく改善を進めている。本研究は大阪大学蛋白質研究所機能・発現プロテオミクス研究系との共同研究である。

1-c 核-細胞質間分子輸送因子の作用で分裂期染色体にローディングする因子の探索

昨年度、私たちは、importin α と importin β で核内に輸送される基質として同定したクロモキネシン Kid/Kinesin-10 が、importin α を介して importin β に結合するとはじめて分裂期染色体にターゲットし、染色体上で局所的に産生される低分子量 GTPase RanGTP に共役して分裂期染色体上に蓄積していくこととはじめて見つけた(Tahara et al., J. Cell Biol. 2008)。この思いがけない現象が普遍的なものかどうかを明らかにするため、細胞分裂期染色体に結合する因子の中で、importin β ファミリー運搬体分子と相互作用し、かつ、低分子量 GTPase Ran の点変異体の作用で分裂期染色体へのローディングが乱される因子の探索を開始している。調べたいいくつかの因子の中で、importin β と importin 7 両方の運搬体分子で核内に運搬されるヒストン H1 が、精製運搬体分子に結合して分裂期染色体にローディングされることがわかった。現在、生殖細胞型や体細胞型のヒストン H1 バリエーション、並びに、それらのリン酸化フォームについて、染色体ローディングにおける運搬体分子と低分子量 GTPase Ran の作用について、解析を進めている。

2 . 細胞核の機能的構造構築の理解 (前島、船越、渡邊、飯野、Vedecnic、日原、今本)

2-a 核膜孔に注目した細胞周期や分化における細胞核動態の解析

細胞核は様々な細胞に即したゲノムの高次構造を維持し、その細胞の機能に応じたゲノムの複製や個々の遺伝子調節を支えている。私たちは核膜上のもっとも顕著な構造体である核膜孔を指標として、細胞核の動的な形成過程の解析をおこなってきた。その結果、核膜新生直後の分裂終期からG1初期の核膜上に、核膜孔が存在しない領域が存在することを明らかにし、あたらしい核膜ドメインとして“Pore-free island”と名付けた (Maeshima et al., J. Cell Science, 2006)。さらに、脳研究センター・神経構築グループの中臣・端川らとの共同研究で、Freeze-fractureしたHeLaS3細胞の核表面の走査電子顕微鏡観察をおこない、核膜上に広がる1つ1つの核膜孔複合体やPore-free islandをイメージングした。

核膜孔複合体は、数個のサブコンプレックスから形成されることが近年明らかになっている。このため、私たちは各サブコンプレックスに含まれる代表的な蛋白質に蛍光タグを付け、HeLa細胞内で発現させて安定発現株を作製した。これらの安定発現株では核膜孔がラベルされ、そのダイナミクスをライブ観察することが可能となった。とりわけ、複合体の中で最も安定に存在するNup133-YFPやNup107-YFPの発現株では、488nmレーザーをもちいて核膜表面のある核膜孔領域をbleachすることができ、新たに形成された核膜孔を可視化できるようになった。この手法と細胞周期の阻害剤を組み合わせることによって、間期の核膜孔形成が、細胞周期によって厳密にコントロールされていることが示された。前述の走査電子顕微鏡観察では、

増殖期細胞において、核膜孔の形成過程らしき前駆体構造も得られている。このような前駆体は脳のプリキンエ細胞など、分化細胞では観察されなかった。さらに興味深いことに、細胞周期の阻害剤によって、間期の核膜孔の形成は阻害されたが、細胞核の成長は阻害されなかった。このことは、細胞核の構築と、その核膜上にある核膜孔の構築が異なるメカニズムで制御されていることを意味している(投稿準備中)。

このような間期の核膜孔形成のメカニズムをためには、核膜孔形成を人為的にコントロールするシステムがあれば非常に便利である。この目的のため、私たちはRanGTPaseサイクルを制御するRCC1の温度感受性変異体であるtsBN2細胞を用いて、温度依存的に核膜孔形成を制御できる哺乳類の系をはじめて確立した。今後、この系を用いて、間期の核膜孔形成のメカニズムを解析していく予定である。

2-b 核膜形成分子機構の解析を可能にする再構築系の樹立

進化の過程で真核生物が獲得した核膜は、遺伝子を封入して遺伝子機能を担う因子群を濃縮するだけでなく、高次クロマチン構築の重要な足場として、遺伝子の発現制御と深く関わる細胞内構造である。高等真核生物の有糸分裂では、核膜は染色体凝縮に伴って崩壊し、分配を終えた姉妹染色体周囲に再形成される。分裂終期における核膜形成過程を詳細に観察すると、核膜孔複合体構成因子、核内膜因子、核膜前駆体小胞の各々が姉妹染色体上に集積し、それぞれの因子が染色体上の異なる部位に局在していく。つまり、間期においてクロマチン構築の足場となる核膜は、形成する際には染色体を足場にするのである。核膜が遺伝子の編成に深く関わることを示す事例の1つである。この核膜形成過程を理解するため、ヒト分裂期細胞を用いて、*in vitro*の核膜形成再構築系の樹立を試みた。蛍光タンパク質で標識した膜貫通型の、核内膜因子や核膜孔複合体構成因子を同時に発現するヒト細胞株(HeLa Cell)を取得し、そのセミインタクト細胞を利用することを考えた。界面活性剤ジギトニン処理で作製したセミインタクト細胞は、コレステロールに富む細胞膜を可溶化するが、コレステロールが少ない細胞内膜系はインタクトに維持されるからである。予備的知見を得るため、膜貫通型の核膜孔複合体構成因子や核内膜因子に、蛍光タンパク質を結合させ、それらが安定に発現する細胞株を取得した。これらの細胞から作製したセミインタクト細胞に、分裂期に同調した細胞から得た抽出液を添加すると、核膜因子の染色体側部へのターゲットが先ず誘引され、引き続いて染色体上での局在化が見られた。これら核膜タンパク質の挙動が、生細胞で見られるものと一致することから、核膜形成の初期反応が、*in vitro*で再現できたことになる。今回樹立したこの再構築系を利用することで、核膜形成を担う可溶性因子、核膜因子の局在化機構、核膜因子を集積させる染色体側要素の解析が可能となる。

3. ゲノムの複製と分配の解析(高木、前島、水野、深瀬、今本)

3-a 分裂期染色体表層に局在する分子が染色体動態を制御する分子機構

私達は分裂期染色体表層に局在するタンパク質(クマドリン)の機能解析を行い、クマドリンが分裂期染色体の適切な動態に寄与する分子であることをこれまでに示した。本年度は、クマドリンが機能発現するための分子基盤を明らかにするために、クマドリンとキネシン様モータータンパク質 Hk1p2 との機能的協調について解析した。Hk1p2 については、クマドリンと分裂期特異的に相互作用することを以前に報告したが、正確な局在や具体的な機能が未知のままであった。そこで新たに作成した特異的抗体を利用し、Hk1p2 が分裂期紡錘体および中期染色体の近傍に局在することをまず示した。また、RNA 干渉法により培養細胞から Hk1p2 を除去しても細胞分裂過程に重篤な影響を及ぼさないことを示した。一方で、Hk1p2 除去細胞における分裂期紡錘体が、monastrol(双極性紡錘体形成において重要なキネシン様モーターである Eg5 の活性を阻害する薬剤)に対する高い感受性を獲得しており、低濃度の monastrol 処理により容易に崩壊することを示した。

クマドリンを RNA 干渉法により培養細胞から除去すると、中期染色体の整列が乱されることを既に示した。今年度は、この現象の分子的背景を多面的に検討した。クマドリンを除去してもキネトコア機能は保たれており、また hKid や hKIF4 のようなクロモキネシン(クロマチン結合性キネシン様モータータンパク質)の局在性も正常であった。これとは対照的に、Hk1p2 の正常な局在性は損なわれ、特に染色体近傍への局在性が失われた。興味深いことに、クマドリン除去細胞における分裂期紡錘体は、monastrol に対する感受性が減じていた。また、monastrol 除去による双極性紡錘体再形成の進行も、対照細胞に較べ顕著に早かった。以上の観察を総合し、Hk1p2 は双極性紡錘体の形成または維持に関与する分子であり、クマドリンは Hk1p2 を適切に局在させることにより機能的な紡錘体形成に寄与しているものと推察された。本

研究は、David Vanneste と Isabelle Vernos 両博士 (Centre de Regulacio Genomica, Spain) との共同研究である。

クマドリンは、Hklp2以外にも多数の相互作用因子を持つことが明らかであり、本研究で明らかにされたのはクマドリン機能発現機構の一端にすぎない。他の機能的側面 (例えば染色体高次構造構築への関与) に着目した研究も鋭意進行中である。

3-b ヒト分裂期染色体構造の解析

染色体は細胞が分裂する際、複製された遺伝情報 (DNA) を 2 つの娘細胞に正確に分配するために必要な構造体である。それでは、分裂期染色体はどのようにして 1 本の長いクロマチン繊維から折り畳まれているのだろうか? 問いに答えるため、私たちは、ドイツEMBLグループと共同で、分裂期染色体のクライオ電子顕微鏡観察 (CEMOVIS) をおこなった。CEMOVISは「生きた」状態に近い細胞内微小構造を観察するためのほとんど唯一の手段である。すると驚いたことに、ヌクレオソームの直径に相当する11nmより大きな構造は、30nmクロマチン繊維も含めて検出されなかった (Eltsov, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008)。しかしながら、顕微鏡観察は試料中における観察範囲が限定され、内在する規則性構造の全体像を捉えることが非常に困難である。このため、私たちはSPring-8 BL45XUでX線小角散乱解析(SAXS)をおこなっている (播磨研究所の伊藤らと共同研究)。SAXSは、計測したい非結晶試料にX線を照射し、その散乱パターンからその試料に内在する構造や規則性を知る手段である。現在までに染色体中に、コアヒストンの幅、ヌクレオソームの直径に相当する6nmと11nmの散乱のピークを検出したが、それ以上の大きな構造はやはり検出できなかった。このことから私たちは、染色体内には古くからのモデルが提唱するような明確な階層構造は存在しないのではないかと考えている (投稿準備中)。さらに、播磨理研の西野らと共同で、SPring-8 BL29XULのコヒーレントX線による単一のヒト染色体の丸ごとのイメージングもおこなっている (CXDM)。私たちは最近、このCXDMを用いてヒト染色体の3次元電子密度マップの作製に成功した (Nishino et al., Phys Rev Lett., 2009)。

3-c アフリカツメガエルCtf7/Eco1アセチル基転移酵素の同定と基本的性状の解析

姉妹染色体コヒーションは分裂期染色体の正確な分配に重要である。コヒージン複合体が姉妹染色体コヒーションの実行因子として重要な働きをする一方で、Ctf7/Eco1アセチル基転移酵素などの因子群の重要性も酵母、ハエ、ヒトなどの細胞において示されている。私達はCtf7/Eco1のアフリカツメガエルホモログを新たに同定し、その基本的性状を解析した。姉妹染色体コヒーションの分子機構を理解する一助としたい。

3-d 染色体複製の分子機構の解析

マウス複製前複合体の機能解析を目指し、マウスORCのDNA結合活性について検討した。N末端を削ったりコンビナントのマウスORC1とORC2は、Orc1-5の安定な複合体を形成し、かつ、DNA結合活性を有することがわかった。そのDNA結合活性を、ゲルシフトアッセイとBIACOREを用いた表面プラズモンアッセイにより解析した。その結果、ORC複合体は一本鎖と二本鎖DNAに結合するが、バブル構造を有する二本鎖のDNA基質に、より高い親和性が示された。バブル構造としては1塩基のミスマッチ状のバブル構造で十分であり、10塩基程度までのバブルに結合する結果を得ている。

ヒトのゲノムには、14種類のDNAポリメラーゼが存在する。染色体複製は、 α 、 β 、 γ の3種類のDNAポリメラーゼが中心に行うと考えられている。最近、出芽酵母のDNAポリメラーゼ α が少なくともARS401とARS504の複製開始点においてleading鎖を合成することが報告された。ほ乳類細胞においても同じように、DNAポリメラーゼの機能分担があるかどうかについて興味もたれる。放線菌由来の代謝物、dehydroaltenuisinがほ乳類細胞由来のDNAポリメラーゼ α を特異的に阻害することから、その誘導体を作製したところ、炭素鎖長12の脂肪酸を付加した誘導体「C12」が最も強力にDNAポリメラーゼ α を阻害することがわかった。

Key Sentence :

1. Nuclear transport
2. Nuclear envelope, nuclear pore formation and chromatin structure

3. Chromosome segregation and replication

Key Word :

Cell nucleus, Nuclear envelope, Nuclear pore complex, Nuclear transport, Chromosome, Cell cycle

Purpose of Research

In eukaryotic cells, most of genomic information is stored in the cell nucleus. The main subject of our laboratory is to understand the nucleocytoplasmic transport and organization of cell nucleus to uncover new aspects and principles on regulation and maintenance of nuclear function. Our current effort has been focused on dissecting the dynamic behavior of nucleocytoplasmic transport machinery, transport pathways, and functional relation between nuclear envelope and chromatin structure in the context of live cells and cell-free reconstituted systems. We are taking cell biological, molecular biological, and biochemical approaches coupled with newly developed imaging techniques.

1. Nuclear transport

1-a. Analysis of the mechanism of nuclear import of 70kDa heat shock cognate protein (Hsc70)

In response to heat shock, molecular chaperone Hsc70 accumulates rapidly into the nucleus from the cytoplasm, whereas the suppression of nuclear import mediated by classical NLSs occurs by the strong inhibition of recycling of importin α , which are NLS receptors, from the nucleus to the cytoplasm. The mechanism of nucleocytoplasmic shuttling of Hsc70 is largely unknown. To analysis the nuclear import of Hsc70, we have developed in vitro transport system using cell extract from heat shocked HeLa cells. In vitro transport assays showed that nuclear import of Hsc70 is likely to be importin β family independent. Furthermore, we have identified a protein of unknown function, as a facilitator of nuclear import of Hsc70 by biochemical purification of cell extracts.

1-b. Approach to identify specific cargos for each member of importin β family proteins.

Nucleocytoplasmic transport of proteins, which occurs through the nuclear pore complex (NPC), is essential for all eukaryotic cellular processes. As the NPC forms a selective barrier, many of the nuclear proteins penetrate into the NPC with mediation by a member of the importin β family proteins, which includes 21 species in human. Each importin β might well equip distinct transport kinetics, and may have distinct roles in cellular activities. To elucidate the transport mechanism inclusively, comprehensive information on the connections between importin β family carrier proteins and their cargos must be acquired. Because we only have limited examples of cargos, depending on importin β family proteins, we are developing a system for identifying specific cargos for each member of importins, based on the the *in vitro* nuclear transport system, combined with the use of SILAC (stable isotopic labeling by amino acid in cell culture), and mass spectrometry analysis.

1-c. A novel mitotic role of importin β and small GTPase Ran

Nucleocytoplasmic transport factors mediate various cellular processes, including nuclear transport, spindle assembly, and nuclear envelope/pore formation. We have recently identified that the human chromokinesin Kid (hKid), which is an import cargo of the importin- α/β transport pathway, are loaded onto mitotic chromosomes, depending on importin β and local generation of RanGTP at chromosomes. Using permeabilized mitotic cells and several purified recombinant importin β family proteins, we are currently investigating the second and third examples of protein that behave similarly as hKid, based on criteria of importin-binding, and inhibition of chromosome loading by point mutated Ran.

2. Nuclear envelope, nuclear pore formation and chromatin structure

2-a. Analysis of nuclear pore dynamics and formation during cell cycle

Nuclear pore complexes (NPCs), sophisticated gateways between cytoplasm and nucleoplasm, are the most notable structures on the nuclear membrane. Through investigation of the dynamic behavior of NPCs, we found a novel nuclear subdomain, a "pore-free island". This pore-free island changes significantly during the cell cycle and cell differentiation, suggesting that the nuclear structures are

dynamically regulated reflecting the physiological state of the cells (Maeshima et al., J. Cell Science, 2006. Recently, we established a novel imaging system to visualize newly formed NPCs. Using the systems, we were able to show that such NPC formation is strictly regulated in a cell-cycle dependent manner.

2-b. Analysis of post-mitotic nuclear envelope assembly

The nuclear envelope (NE) is a cellular structure that encloses genomic information and provide physicochemical framework for genetic activities such as gene expression and DNA replication. In higher eukaryotes, nuclear envelope and nuclear pore complex (NPC) disassembles upon on-set of mitosis as a prelude to spindle assembly and chromosome segregation. Such disassembly necessitates nuclear envelope and NPC reformation around each set of segregated sister chromosomes toward the end of mitosis.

In this study, we have examined the post-mitotic nuclear envelope reassembly process in human cultured cells. Initially, we have established several cell lines stably expressing one or two fluorescently labeled membrane-anchored inner nuclear envelope proteins and/or pore-membrane protein. Live imaging analysis showed that all the marker proteins examined target chromosome edge, but only lamin A binding proteins, such as emerin, immediately re-localized to the core region of sister chromosomes, as was previously reported by several groups. Furthermore, live analysis indicated that initial targeting of pore-membrane proteins, and inner nuclear envelope proteins, to the chromosome edge are mutually related process. In order to analyze molecular mechanism of these post-mitotic nuclear envelope assembly events, we reconstituted the in vitro nuclear envelope assembly system, using permeabilized mitotic HeLa cells. In this system, targeting of all the marker proteins to the chromosome edge, as well as re-localization of emerin to the chromosome core, were both dependent on exogenously added cytosol and ATP.

3. Chromosome segregation and replication

3-a. Dissection of the molecular basis on how Ki67/chmadrin contributes to the proper behavior of mitotic chromosomes.

We previously found that silencing the expression of Ki67/chmadrin in HeLa cells results in mild chromosome alignment defects during mitosis. To understand the molecular basis of this phenomenon, we asked the relevance of the interaction of Ki67/chmadrin with Hklp2, a member of the kinesin-15 family. We started with reexamination of the localization of Hklp2 using newly raised antibodies and showed that Hklp2 localized along spindle microtubules and in the proximity of the aligned chromosomes. Although Hklp2 silencing had no major consequences on cell division, it promoted a higher percentage of spindle collapse upon partial inhibition of the kinesin-5 motor protein Eg5 by monastrol. We next found that Hklp2 localization was altered in metaphase cells lacking Ki67/chmadrin. Consistently, Hklp2 localization was also altered in Ki67/chmadrin silenced cells treated with monastrol. Interestingly, these cells are more resistant to the collapse of the poles than control cells. In addition, cells having monopolar spindles re-establish faster a bipolar spindle after monastrol wash-out than controls. We propose that Hklp2 participates in the establishment or maintenance of spindle bipolarity. In addition, our data suggest that Ki67/chmadrin participates in the establishment of a functional spindle, a function that may be at least in part related to its role in mediating the localization of Hklp2. This work was done in collaboration with Drs. David Vanneste & Isabelle Vernos (Centre de Regulacio Genomica, Spain) .

3-b. Structural analysis of mitotic chromosomes

Mitotic chromosomes are essential structures for the faithful transmission of the genetic information at each cell division. However, how the two meters of DNA that is present in each human cell is packaged into compact mitotic chromosomes (a 10,000-fold shortening) remains largely unknown. When we observed frozen hydrated mitotic cells using cryo-electron microscopy and subsequent computational image processing, which enable direct high-resolution imaging of the cell structures in a close-to-native state, we did not find any higher-order structures, or even 30-nm chromatin fibers, but just a uniform

disordered texture (Eltsov, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008). To further investigate the structure of mitotic chromosome, at RIKEN SPring-8 we are investigating chromosome structure using small angle X-ray scattering analysis (SAXS), which makes it possible for us to detect internal regular structures in non-crystal materials in solution.

3-c. Cloning of *Xenopus* orthologs of Ctf7/Eco1 acetyltransferase and initial characterization of XEco2
Sister chromatid cohesion is important for the correct alignment and segregation of chromosomes during cell division. Although the cohesin complex plays a physical role in holding sister chromatids together, other factors such as Ctf7/Eco1 acetyltransferase has been shown to be also necessary for the process. We cloned two *Xenopus* orthologs of Ctf7/Eco1, XEco1 and XEco2, to dissect the role of them in the well established in vitro system based on the use of *Xenopus* egg extracts. This study will serve as a platform for elucidating the molecular function of Ctf7/Eco1 acetyltransferase in the establishment of sister chromatid cohesion in future studies.

3-d. Analysis of mammalian pre-replicative complex

Loading of the origin recognition complex (ORC) onto the chromatin is essential for the assembly of the pre-replicative complex. To examine the complex assembly, we purified N-terminal truncated recombinant ORC1-5 complex. Next, we examined DNA binding activity of ORC2-5 complex and N terminal-truncated ORC1-5 complex, using electrophoretic mobility shift assay as well as BIACORE assay. We found ORC1-5 complex not only binds to single-stranded DNA and double-stranded DNA, but also to a double-stranded DNA possessing bubble-like structure with highest affinity. As for bubble-like structure, one base mismatch is enough for high affinity, and binds to up to 10 base-pair bubble.

Head

今本 尚子 Naoko Imamoto

Members

深瀬 明子 Akiko Fukase
船越 智子 Tomoko Funakoshi
日原 さえら Saera Hihara
木村 誠 Makoto Kimura
小瀬 真吾 Shingo Kose
前島 一博 Kazuhiro Maeshima
水野 武 Takeshi Mizuno
田原 清志 Kiyoshi Tahara
高木 昌俊 Masatoshi Takagi
渡邊 愛 Ai Watanabe

Visiting Members

Michaela Vedecnik Trainees

飯野 治樹 Haruki Iino
横山 知美 Tomomi Yokoyama

Assistant and Part-timer

吉川 啓子 Keiko Yoshikawa