

## 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、神経幹細胞、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（カエル卵抽出液・培養細胞・卵母細胞・紅藻細胞・バクテリア）と多角的なアプローチ（生化学・細胞生物学・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。

### ヌクレオソームを含まない染色体の解析（新富、平野）

分裂期染色体は、ヌクレオソーム形成を出発点とするクロマチン繊維の階層的な折り畳みの産物であると考えられている。しかし、ヌクレオソームは高次の染色体構造を作るために本当に不可欠なのだろうか？この問題を検証する目的で、もともとヒストンを含まないマウス精子核とカエル卵抽出液を組合せて、試験管内で染色体構築を再現できる無細胞系を考案した。この実験系では、卵抽出液からヒストンシャペロンAsf1を除去することにより、精子DNA上へのヒストンの供給を完全に阻害することができる。驚いたことに、この条件下ではヌクレオソームができないにもかかわらず、染色体様の構造が形成された。このヌクレオソームを含まない染色体は、コンデンシンが集積した軸を持つものの、通常のヌクレオソームを含む染色体と比べてループ領域の凝縮の程度が低く、構造的に脆弱だった。さらに、コンデンシン I と II のいずれかとAsf1を同時に除去する実験から、コンデンシン II はヌクレオソーム非依存的に染色体軸に集積しうるのに対し、コンデンシン I の正常な機能にはヌクレオソームとコンデンシン II の両者が必要であることがわかった。今後は、この新規実験系を用いてコンデンシンとヌクレオソームの機能がどのように関連しているのかについて詳細に解析する予定である。

### 組換えサブユニットから再構成したコンデンシン I 複合体の機能解析（木下、平野）

真核生物のコンデンシン I 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構成される。我々はこれまでに、哺乳類コンデンシン I 複合体の発現・精製系を確立し、野生型ホロ複合体および制御サブユニットを欠いた欠失型サブ複合体を再構成することに成功している。さらに、これらの複合体とカエル卵抽出液の染色体再構成系を組み合わせた解析から、HEATリピートを有する二つの制御サブユニットの拮抗的な機能が染色体の軸構造の形成に寄与することを明らかにしてきた。本年度は、もう一つの制御サブユニットであるkleisinサブユニットに注目して解析を進めた結果、特にモチーフIIIと呼ばれる領域に変異を導入したホロ複合体が極めて特徴的な染色体構造異常を示すことを見出した。しかし、同じ変異型複合体をマウス精子核を基質とする染色体再構成系に導入すると、カエル精子核を基質にした場合とは大きく異なる表現型が観察された。この結果は、二つの基質の異なる性質（例えば、残存するヒストンの組成やDNAの絡み合い等）が、この変異型複合体の働きに大きく影響することを示唆している。今後、kleisinサブユニットがいかんしてHEATサブユニットと協

調しながらコンデンシン I の機能に寄与するのか、その分子メカニズムの詳細を明らかにしたい。

#### コンデンシン I の活性化における CDK1 の役割 (田根、平野)

コンデンシン I は、染色体構築過程において中心的な役割を果たすタンパク質複合体である。最近の我々の研究によれば、6種類の精製タンパク質を用いた試験管内染色体再構成系において、分裂期キナーゼCDK1によるコンデンシン I のリン酸化が染色体再構成に必要なタンパク質修飾であることが示されている。しかし、コンデンシン I のどのサブユニットのどの部位が CDK1 によってリン酸化されるのか、そして個々のリン酸化反応がコンデンシン I の機能をどのように制御しているのかについては十分に理解されていない。我々はまず、コンデンシン I サブユニット内にある計10ヶ所の CDK1 リン酸化候補部位にアラニン変異を導入したホロ複合体 (10A 変異体) を発現・精製した。そして、内在性コンデンシンを除いたカエル卵抽出液へこの10A 変異体を添加し、その変異体を引き起こす染色体形態の異常について観察を行った。その結果、野生型に比べ 10A 変異体では、若干の染色体形態の異常が観察されたものの、依然として染色体構造の形成が見られた。このことは今回調べた候補部位以外のリン酸化も染色体形成に関与していることを示唆している。今後さらに他の候補部位にも解析を広げることにより、コンデンシンのリン酸化制御の全貌を明らかにしていきたい。

#### コンデンシン II 複合体の機能解析 (香西、平野)

有糸分裂に起こる染色体構築の変化は細胞分裂を成功させるために不可欠なプロセスである。この過程に中心的な役割を果たすのがコンデンシンと呼ばれる巨大なタンパク質複合体であり、多くの真核細胞はコンデンシン I に加えて第2の複合体コンデンシン II を有する。分裂期染色体の構築におけるコンデンシン I のサブユニットの機能が明らかになりつつあるが、コンデンシン II のサブユニットについての理解はいまだ乏しい。我々は、コンデンシン II のサブユニットの機能解析を行うため、哺乳類のコンデンシン II 組換え型複合体 (野生型および特定の制御サブユニットを欠いた欠失型サブ複合体等の変異型複合体) の発現と精製に成功した。現在、これらのコンデンシン II 組換え型複合体をカエル卵抽出液を用いた染色体再構成系に導入し、染色体構築に与える影響を検討している。今後、野生型と欠失型サブ複合体の染色体構築における影響、および他の因子 (コンデンシン I、トポイソメラーゼ II 等) の機能に対して与える影響を比較することを通して、コンデンシン II 複合体の各サブユニットの役割を解明したい。

#### 染色体の可逆的再組織化におけるコンデンシンの役割 (小野、平野)

コンデンシン I と II は分裂期染色体の構築に中心的な役割をもつタンパク質複合体であり、中期にはトポイソメラーゼ II  $\alpha$  (トポ II  $\alpha$ ) とともに姉妹染色分体の縦軸に集中して局在する。しかし、染色体軸がどのようにして形成され、染色体構築にどのような貢献をしているのかはよく分かっていない。我々はこの問題に物理化学的観点から取り組むため、カバーガラス上で培養した HeLa 細胞を用いて染色体構造の可逆的集合 (再組織化) を誘導する実験系を確立した。この実験系では、 $Mg^{2+}$ キレート剤を含む低張バッファーで膨潤させた染色体 (ステップ 1) を、NaCl 濃度依存的に異なる形態に変換 (ステップ 2) することができる (sodium chloride-induced chromosome conversion [SCC] assay)。ステップ 2 で 100 mM NaCl による処理を行うと、クロマチンと染色体軸はほぼ元の形状に回復し、染色体構造が再組織化される。今年度は、この再組織化反応におけるコンデンシンとトポ II  $\alpha$  の役割を調べた。それぞれのタンパク質を siRNA によって除去した細胞を SCC アッセイで解析したところ、クロマチン形態の回復はコンデンシン II の除去で大きく損なわれたが、コンデンシン I あるいはトポ II  $\alpha$  の除去は回復に大きな影響は見られなかった。さらに機械学習 (wncdchr) による定量的形態学的分析をおこない、クロマチン形態の回復がコンデンシン II による染色体軸の再組織化と密接に関連することを明らかにした。

#### バクテリア型コンデンシンの分子構造学的解析 (鎌田、平野)

バクテリアでは、真核細胞のコンデンシンによく似た複合体が核様体の構造維持と分配に重要な働きを担っている。この複合体は、複製開始点近傍に結合する蛋白質に依存して染色体にリクルートされ、やがて複製終結点の方向へ移動することが示されているが、その詳細な分子機構は明らかではない。バクテリア型コンデンシンは、SMC ホモ二量体と二種の制御因子から構成される。V字型の SMC 二量体は、その両端に ATP 加水分解反応を担う領域 (ヘッドドメイン) を有しており、制御サブユニットは二つのヘッドドメインの近傍に非対称に結合する。そして、ATP 加水分解のエネルギーを利用することにより、開いた V字型の複合体を閉じた I字型へ変換すると予測されている。実際、制御サブ

ユニットにヘッドドメインとより安定に結合する変異を導入すると、複合体全体の構造はI字型へと大きく傾くばかりでなく、酵素学的にも野生型と異なる反応サイクルを示した。さらに、この変異を含む複合体は枯草菌内では染色体に過剰にリクルートされることがわかった。さらにクロスリンカーを用いた実験からも、野生型複合体では、一部の制御サブユニットの構造を変化させることによってI字構造を維持していることが示唆された。

## 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
3. To understand the molecular basis of human diseases accompanying chromosomal defects

### Key Words:

chromosomes, sister chromatids, chromosome segregation, chromosome condensation, cell cycle, neural stem cells, 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. In particular, we are interested in dissecting the structure and function of a highly-conserved class of large protein complexes, known as condensins, that play central roles in these processes. Many eukaryotic cells have two different condensin complexes (condensins I and II) that are subjected to differential cell cycle regulation and have both overlapping and non-overlapping functions. The two complexes share a heterodimeric pair of SMC (structural maintenance of chromosomes) ATPase subunits, and contain different sets of non-SMC regulatory subunits. Our laboratory takes multidisciplinary approaches (biochemistry, cell biology, genetics and structural biology) to understanding how condensins might work at a mechanistic level both in vitro and in vivo.

### Dissection of nucleosome-depleted mitotic chromosomes (Shintomi, Hirano)

During mitosis, duplicated nucleosome fibers are folded into a pair of rod-shaped chromatids to make a chromosome. It had remained unclear, however, whether nucleosome assembly is indeed an essential prerequisite for large-scale assembly of chromatids. To directly address this question, we devised a cell-free system in which mitotic chromatids were assembled in frog egg extracts starting from mouse sperm nuclei that are largely devoid of histones. We then used an extract depleted of the histone chaperone Asf1, and found, to our surprise, that chromatid-like structures could be built even in the near complete absence of nucleosomes. The resultant “nucleosome-depleted” chromatids, which contained discrete axes positive for condensins, were sparser and more fragile than normal nucleosome-containing chromatids. Depletion of Asf1 and condensins in various combinations allowed us to find that condensin II can localize on chromatid axes independently of nucleosomes whereas proper actions of condensin I rely on both nucleosomes and condensin II. Further analyses using this cell-free system will be instrumental in understanding how functional crosstalk between nucleosomes and condensins might be achieved at a mechanistic level.

### Functional analyses of recombinant condensin I complexes in vitro (Kinoshita, Hirano)

The eukaryotic condensin I complex is composed of a pair of SMC ATPase subunits and three non-SMC regulatory subunits. By combining recombinant condensin I complexes (either wild type or mutant complexes) and frog egg extracts in which mitotic chromosomes can be assembled in vitro, we had previously demonstrated that balancing acts of two regulatory subunits containing HEAT repeats support dynamic assembly of chromosome axes. During the past year, we focused on dissecting the role of the kleisin subunit, another regulatory subunit of condensin I. We found that a holocomplex harboring point mutations in a kleisin's subdomain called ‘motif III’ produced an unprecedented phenotype, characterized by entangled axes within banana-shaped chromatin. The same mutant complex, however, displayed a substantially different phenotype when mouse sperm nuclei were used as substrates instead of frog ones. These results suggested that different characters of the substrates (e. g., histone compositions and degrees of DNA catenation) might have differential impacts on the action of this particular mutant complex. We now plan to further

clarify the detailed molecular mechanisms of how the kleisin subunit contributes to the condensin I function in cooperation with the pair of HEAT subunits.

#### **Roles of CDK1 phosphorylation of condensin I in mitotic chromosome assembly** (Tane, Hirano)

Condensin I is a five-subunit protein complex that plays a central role in mitotic chromosome assembly. In a chromatid assembly assay using six purified factors *in vitro*, it had been demonstrated that CDK1 phosphorylation of condensin I is the sole modification required and sufficient for mitotic chromatid reconstitution. It remained unknown, however, which subunits of condensin I (and which sites of them) are phosphorylated and how phosphorylation of those individual sites regulates condensin I's functions. To address these questions, we expressed and purified a mutant holo-complex harboring alanine mutations in ten of the potential CDK1 phosphorylation sites (10A mutant), and examined their ability to assemble chromosomes by adding them back into a *Xenopus* egg extract depleted of endogenous condensin complexes. We found that the 10A mutant was still able to produce fibrous structures although their morphology was poorer than that supported by the wild type complex. Our data suggest that phosphorylation of additional CDK1 sites is required for complete assembly of mitotic chromatids. We will therefore explore additional phosphorylation site mutations to make a comprehensive picture of phosphoregulation of condensin I during mitosis.

#### **In vitro functional analysis of the condensin II complex** (Kozai, Hirano)

Drastic changes in the organization of chromosomal structure during mitosis are essential for successful cell division. Central to this process is a class of large protein complexes, known as condensins, and many eukaryotic cells possess a second condensin complex (condensin II) in addition to the canonical condensin I complex. While studies revealing the molecular mechanisms of action of condensin I have started to emerge, biochemical activities of condensin II remain completely unknown. To uncover the molecular mechanisms of condensin II, we established an experimental protocol for reconstituting mammalian condensin II – wild-type and mutant complexes – from its recombinant subunits. Our current plan is to use these recombinant condensin II complexes in functional assays using *Xenopus* egg extracts and to dissect its function and cooperation with condensin I in chromosome assembly.

#### **Roles of condensins to reversible assembly of chromosome in situ** (Ono, Hirano)

Condensins I and II are multiprotein complexes that play a central role in mitotic chromosome assembly and segregation. Although both complexes become concentrated along the axial region of each chromatid by metaphase, it remains unclear exactly how such axes might assemble and contribute to chromosome shaping. To address these questions from a physico-chemical point of view, we established a set of two-step protocols for inducing reversible assembly of chromosome structure *in situ*, termed “sodium chloride-induced chromosome conversion (SCC) assay”. In this assay, mitotic chromosomes were first expanded in a hypotonic buffer containing a Mg<sup>2+</sup>-chelating agent (step 1) and then converted into different shapes in a NaCl concentration-dependent manner (step 2). Both chromatin and condensin-positive chromosome axes were recovered to near-original shapes at 100 mM NaCl. This assay combined with siRNA depletion demonstrated that the recovery of chromatin shapes and the reorganization of chromosome axes were both sensitive to depletion of condensin II, but less sensitive to depletion of condensin I or topoisomerase II $\alpha$ . Furthermore, quantitative morphological analyses using the machine-learning algorithm *wndchrm* supported the notion that chromosome shaping is tightly coupled to the reorganization of condensin II-based axes.

#### **Molecular and structural analyses of the bacterial condensin complex** (Kamada, Hirano)

Maintaining genome stability in prokaryotes requires many nucleoid-associated factors, including a condensin-like complex that plays a crucial role in the organization and segregation of the nucleoid. Although this complex is recruited to the origin-proximal region and then travels toward the terminus, its molecular mechanism remains poorly understood. The complex is composed of an SMC homodimer and a regulatory subcomplex containing two other factors. The SMC dimer is a V-shaped molecule with an ATP-binding head domain at each distal end, and the regulatory subcomplex makes an asymmetrical bridge between the two head domains. It had been hypothesized that ATP-hydrolysis energy helps to convert the whole complex with an open-V shape

into a closed-I shape, and that this conformational change is functionally important for SMC's action. We found that certain mutations in a regulatory subunit promote stable binding of the subcomplex to the SMC head domain, change the overall shapes of the whole complex, and affect the kinetics of ATP hydrolysis *in vitro*. Moreover, an ectopic expression of the mutants induced overloading of the SMC complex to the nucleoid *in vivo*. *In-vivo* crosslinking experiments also supported the idea that expected internal rearrangements within the regulatory subcomplex determine the overall shape of the SMC 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 Fellow***

田根 将志      Shoji Tane  
香西 誠      Makoto Kozai

***Technical Staff***

松浦 明子      Akiko Matsuura

***Assistant***

有光 いずみ      Izumi Arimitsu

***Part-timer***

森山聖子      Seiko Moriyama