

平野染色体ダイナミクス研究室

主任研究員 平野 達也 (Ph.D.)

**(0) 研究分野**

分科会: 生物学

キーワード: 染色体、細胞周期、有糸分裂、コンデンシン、SMCタンパク質

(1) 研究背景と研究目標

染色体は、遺伝情報の担体およびその発現の場として働く細胞内構造体であり、あらゆる生命現象の根幹に位置付けられると言っても過言ではない。では、このDNAとタンパク質の巨大な複合体は、どのように構築され、複製され、次世代の細胞に伝達されていくのだろうか？この問題は、がん細胞の増殖および生殖細胞の形成とも密接な関連をもつことから、医学的見地からみてもきわめて重要である。当研究室では、染色体の高次構造変換を制御する分子群、特に我々自身が発見したコンデンシンと呼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。精製タンパク質を用いた生化学・構造学的解析、カエル卵抽出液を用いた再構成系、培養細胞を用いた生体内での染色体動態の解析等、多彩なアプローチを駆使してこの問題に取り組むとともに、染色体ダイナミクス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、これまでとは違った視点から研究を推進している。

(2) 研究成果(2023年度)**(A) 組換え型複合体を用いたコンデンシンIとIIの機能解析**

多くの真核生物は、2種類のコンデンシン(コンデンシンIとII)を有する。両者は、それぞれ5つのサブユニットから構成される巨大な複合体である。このうち、2つのSMC(structural maintenance of chromosomes) ATPaseサブユニットは両複合体に共有され、3つの制御サブユニットはそれぞれに固有である。2つのコンデンシン複合体はどのような分子メカニズムを通して分裂期染色体の構築に関与しているのか、その協調的な働きはどのように制御されているのか、という問題についての理解は乏しい。我々は、組換え型のコンデンシン複合体を調整し、カエル卵抽出液に由来する試験管内染色体構築系を用いて、その機能を検定する努力を続けてきた。2023年度は、コンデンシンIIのサブユニットCAP-D3のHEATリピートと天然変性領域C-tailの間に、CAP-G2との相互作用に関わるドメイン(“HEAT docker”と命名した)が存在することを見出した。この領域をC-tailと合わせて欠損させると、C-tailのみの欠損と比較してより強い染色体結合活性が観察された。この変異型複合体によって形成される染色体は、コンデンシンI野生型複合体によって形成される染色体によく似ていた。これらの観察は、コンデンシンIIを操作することにより、コンデンシンI様の活性を持つ複合体に変換することが可能であることを示唆した。

(B) 一分子解析を用いたコンデンシンIとトポイソメラーゼIIの協調作用の解明

我々はこれまでに、単純な基質(カエル精子核)とわずか6種類の精製タンパク質を混ぜるだけで分裂期染色体を試験管内で再構成できることを示してきた。この6種類の中でATPase活性を有するタンパク質は、コンデンシンIとトポイソメラーゼII(トポII)の2種類のみである。両者がどのように協調して分裂期染色体構築に関わるかを明らかにする目的で、コンデンシンIの一分子ループ押しアッセイに、トポイソメラーゼIIを共存させたときに起こる事象を観察した(京都大学・西山朋子研究室との共同研究)。昨年度までに、コンデンシンIのみの反応で観察されたループ構造は、トポIIが共存すると、よりコンパクトな構造(ランプ[lump])に変換されることがわかっていた。2023年度は、ランプ内の基質DNAにはコンデンシンIとトポIIの両酵素活性に依存して結び目(knot)が導入されていることを見出した。さらに興味深いことに、その反応が起こるためにはトポIIの(酵素活性には必須でない)カルボキシ

ル末端領域 (CTD) も必須であった。以上の結果は、長年議論されてきた染色体構築におけるトポ II の役割について、新たな示唆を与えるものである。

(C) コンデンシン I と II のリン酸化制御機構の解明に向けて

分裂期染色体構築は、分裂期タンパク質キナーゼ cyclin B-Cdk1 の制御下にあると考えられている。実際、コンデンシン I による DNA 超らせん化活性や染色体構築活性は、cyclin B-Cdk1 に依存したリン酸化によって活性化されることが示されている。しかし、これまでの研究は、天然型コンデンシン I と天然型 cyclin B-Cdk1 を用いた解析に限られていた。コンデンシン I のリン酸化制御機構の詳細を解析するためには、両者を組換え型に置き換える実験系の開発が必須となる。2023年度は、組換え型 cyclin B-Cdk1 とそのアダプター因子 Suc1 を用いて、2つの組換え型コンデンシン複合体 (コンデンシン I とコンデンシン II) を効率よくリン酸化するための条件を見出すことに成功した。今後、複数の機能アッセイ (染色体再構成系やループ押しアッセイ) を駆使してコンデンシン複合体のリン酸化制御機構の全貌を解明していく予定である。

(D) 間期染色体構築におけるコンデンシン II とコヒーシンの協調作用の解析

コンデンシン I と II は細胞周期において異なる時空間制御を受けている。例えば、間期では、コンデンシン I は細胞質に存在するのに対し、コンデンシン II は核内に留まる。しかし、間期核内におけるコンデンシン II の機能については不明な点が多い。昨年度までの観察によれば、G2 期細胞からコヒーシンを除去すると局所的なクロマチン構造 (~1 Mb scale) は乱れるが染色体テリトリーの形態は大きく変化することはなかった。また、コンデンシン II を除去すると中間的染色体構造 (~20 Mb scale) は乱れるが、染色体テリトリーの形態に大きな違いは観察されなかった。2023年度は、コヒーシンとコンデンシン II と同時に除去すると、G2期染色体テリトリーの形態が大きく変化することを見出した。同時除去細胞では、複数の染色体が核小体の辺縁部に集まる像が多数観察された。これらの観察は、コヒーシンとコンデンシン II は異なるレベルで働いているにも関わらず、両者が協調してG2期染色体テリトリーの維持に関わっていることを示唆している。

(3) 研究室メンバー (2023年度)

(主任研究員)

平野達也

(専任研究員)

小野教夫、木下和久、新富圭史

(特別研究員/協力研究員)

香西誠、藤田敏治

(テクニカルスタッフ)

正原由紀、相澤由有希

(アシスタント)

丸山朋子

(研究パートタイマー)

海老原美紀

(4) 発表論文等 (2023年度)

1. Shintomi K, Masahara-Negishi Y, Shima M, Tane S, and Hirano T. "Recombinant cyclin B-Cdk1-Suc1 capable of multi-site mitotic phosphorylation in vitro", PLoS One 19:e0299003 (2024).
2. Yoshida MM, Kinoshita K, Shintomi K, Aizawa Y, and Hirano T. "Regulation of condensin II by self-suppression and release mechanisms", Mol. Biol. Cell, 35(2):ar21 (2024).
3. Yamamoto T, Kinoshita K, and Hirano, T. "Elasticity control of entangled chromosomes: crosstalk between condensin complexes and nucleosomes", Biophys J. 122:P3869-3881 (2023).
4. Hirano T. "Condensins and mitotic genome folding", Research Lecture at Nobel Forum, Karolinska Institutet (February 15, 2024, Stockholm, Sweden).
5. Hirano, T. "A tale of two condensins: molecular dissection of mitotic genome folding machines", Gordon Research Conference on "Chromosome Dynamics" (June 25-30, 2023, Lucca, Italy).

Laboratory Homepage

https://www.riken.jp/research/labs/chief/chromosome_dyn/index.html

<http://www2.riken.jp/chromdyna/>