

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
HIRANO, Tatsuya

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す。この目標に向けて、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いる。さらに、染色体ダイナミクスの進化的基盤、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の研究を推進している。これらの成果とゲノム生物学から発せられる膨大な情報を組み合わせることにより、新しい時代の染色体生物学を開拓していく。

1. コンデンシン複合体の構造生物学 (鎌田勝彦, 平野達也)

真核生物のコンデンシン複合体は、ATP結合モチーフをもつ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。バクテリアにおいても、単一のSMCサブユニットと2種のnon-SMCサブユニットが広く保存されている。我々は、個々の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、枯草菌のコンデンシン複合体をモデル系として、機能領域の同定と生化学的性質の解析を行った。枯草菌の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)とnon-SMCサブユニット(ScpA, ScpB)を大腸菌内で発現させ精製した。精製されたヘッド・ドメインはATP存在化でも単量体として存在したことから、同様な条件下で二量体を形成する他生物の類似ドメインと比べて、相互作用は弱いと考えられた。単独発現したScpAは非常に不溶性であったが、ScpAとScpBを共発現させると、可溶性の高い複合体が得られたばかりでなく、一部のフラクションには単独でも可溶性の高いScpAが回収された。プロテアーゼ部分消化実験の結果と併せると、ScpAはScpBと結合することによって分子内構造変化を起こし、その変化が安定なコンフォメーションをもつコンデンシン複合体の形成に大きく貢献しているらしいことが推測された。

2. 2つのコンデンシンの染色体分布を規定する因子の同定 (小野教夫, 平野達也)

高等真核細胞では、コンデンシンIとコンデンシン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。この2つの複合体は構造的によく似ているが、細胞周期過程では互いに異なる制御を受けている。コンデンシンIが間期で細胞質に局在し、前中期以降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、前期から染色体凝縮に貢献する。また、分裂期染色体における2つの複合体の分布は互いに重ならない。本研究では、2つのコンデンシン複合体の時空間制御の機構を明らかにすることを目標として、それらの染色体分布を決定する因子の検討を進めている。まず、分裂期染色体上のG-バンド領域にはコンデンシンIIが、R-バンド領域にはコンデンシンIが濃縮する傾向にあることがわかった。一般に、G-バンド領域はS期後半に複製され、分裂期にはいるとR-バンド領域よりも早く凝縮することが知られている。そこで我々は、DNA複製と染色体凝縮という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て、その検証を進めている。

3. コンデンシン複合体の多面的機能と細胞周期制御機構の解析 (青野信喜^{*1}, 木下和久, 平野達也)

コンデンシン複合体は分裂期の染色体凝縮ばかりでなく間期においても様々な染色体機能に関与することが、近年の研究によって明らかになりつつある。しかし、高等真核細胞に存在する2つのコンデンシン複合体(コンデンシンIとII)がそれぞれどのような特異的機能を担っているのか、そしてどのような制御機構の下で機能しているのか、についての知見は未だ乏しい。我々は、アフリカツメガエル卵細胞抽出液を用いた*in vitro*アッセイ系を用いてコンデンシン複合体の機能を解析し、コンデンシンIIがストレスのかかった条件下での染色体複製の完了に必須であることを見いだした。また、コンデンシンサブユニットの組換えタンパク質とツメガエル卵抽出液を用いて、コンデンシン複合体が細胞周期進行に伴いどのような制御を受けているかを解析した。その結果、タンパク質リン酸化によるコンデンシンIIの新たな制御機構を見だし、分裂期特異的な制御に必要なタンパク質領域を特定することに成功した。現在、このリン酸化修飾による制御の生理的意義と細胞周期依存的な制御機構の詳細を解明すべく解析を進めている。

4. コンデンシンII複合体の制御因子MCPH1の解析 (山下大輔^{*2}, 平野達也)

コンデンシンIIは、細胞周期を通じて核内に存在し、分裂前期から開始する染色体凝縮過程で重要な役割を果たす。興味深いことに、MCPH1遺伝子に変異を持つ小頭症患者由来の細胞では、分裂期に入る前から染色体の過凝縮が観察されることが知られていたが、最近の研究によれば、この現象はコンデンシンIIの制御異常に起因することが明らかにされている。本研究の目的は、MCPH1タンパク質によるコンデンシンIIの制御機構の解析を通して、正常な染色体凝縮が起こる分子メカニズムを明らかにすることにある。両者の関わりの詳細を明らかにするために、ヒト培養細胞を材料として免疫沈降実験を行った結果、MCPH1とコンデンシンIIが物理的に相互作用していることが分かった。さらに、コンデンシンIIとの相互作用に必要な領域をMCPH1タンパク質内に特定することができた。今後は、ヒト培養細胞を用いた解析に加えて、さらに詳細な生化学的解析と機能検定が可能であるカエル卵抽出液を用いたアプローチも展開する予定である。

5. 哺乳類減数分裂におけるコンデンシンの役割 (李智博^{*2}, 平野達也)

減数分裂では、体細胞分裂と異なり、DNA複製後に2回の分裂が連続して起こる。とりわけ第一減数分裂では染色体は特異的な動きを示す。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二価染色体を形成し、後期には姉妹染色分体ではなく相同染色体が分離する。哺乳類の体細胞分裂ではコンデンシンIとIIがM期染色体の構築に必要である

ことがわかっているが、この2つの複合体を構成するサブユニットが、哺乳類の減数分裂過程でどのような発現パターンを示し、どのようにして染色体の構築に関わるかについては全く分かっていない。本研究の目的は、マウス卵母細胞や精母細胞を研究材料にして、減数分裂に特有な染色体動態にコンデンシンがどのように寄与するかを明らかにすることにある。本年度は、まず解析に必須なツールとして、マウスの全コンデンシンサブユニット(8個)に対する抗体の作製を試みた。マウスの培養細胞(体細胞)を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、コンデンシンIとIIを識別できる抗体ができていたことが確認された。現在、卵母細胞や精母細胞においてコンデンシンの発現解析を行っている。また、減数分裂においてコンデンシンと特異的に相互作用する分子を同定するため、精巣抽出液からコンデンシンサブユニットと共免疫沈降してくるタンパク質の精製条件の検討も進めている。

6. 姉妹染色分体接着の分子メカニズム(新富圭史^{*3}、平野達也)

コヒーシンは、姉妹染色分体の接着に中心的な役割を果たすタンパク質複合体であり、コンデンシンと類似の構造をもつ。しかし、その作用メカニズムは殆ど理解されていない。我々は、コヒーシンの分子動態とその制御機構を解析するため、昆虫細胞を用いてヒトコヒーシンの各サブユニットの組換えタンパク質を発現させ、それらを用いてサブおよびホロ複合体を再構成する方法を確立した。また、試験管内で姉妹染色分体の接着を再現できるツメガエル卵の無細胞系において、再構成した複合体が内在性のものと同様のクロマチンへの結合動態を示すことを確認した。今後は、コアサブユニットのATP結合ドメインのアミノ酸を置換した数種類の変異型コヒーシンを用いて、ATPの結合や加水分解および各サブユニットがコヒーシンのクロマチン結合に果たす役割を検討する予定である。一方、酵母やヒト培養細胞を用いた解析からコヒーシンの制御因子であることが示されている種々のタンパク質についても、特異抗体を用いた卵無細胞系からの免疫除去、組換えタンパク質を用いた相補実験などの方法によって機能解析を進めている。こうした多角的なアプローチによって、細胞周期の進行に応じたコヒーシンの機能制御メカニズムの解明を目指したい。

*1 訪問研究員 *2 協力研究員 *3 基礎科学特別研究員

The long-term goal in this laboratory is to understand the molecular basis of chromosome segregation during mitosis and meiosis. Central to this process are two multiprotein complexes, known as condensin 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 structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins. Mutations in the subunits of condensin and cohesin lead to genome instability in many model organisms, and recent lines of evidence suggest that subtle perturbation of condensin and cohesin functions potentially causes developmental diseases in humans. Our laboratory takes multidisciplinary approaches to understand how condensin, cohesin and SMC proteins might work at a mechanistic level both in vivo and in vitro.

1. Structural biology of the condensin complex (K. Kamada, and T. Hirano)

In eukaryotic cells, the condensin complex consists of two SMC catalytic subunits and three non-SMC regulatory subunits. In many if not all eubacterial species, a related complex exists that is composed of an SMC homodimer and two kinds of non-SMC subunits (known as ScpA and ScpB). To understand the basic mechanism of action of SMC protein complexes, we have used the *Bacillus subtilis* condensin subunits as a model system and characterized their biochemical properties. A truncated form of the ATP-binding 'head' domain of the *B. subtilis* SMC (BsSMC) subunit is found to exist as monomers in the presence of ATP. This result suggests that the ability of the BsSMC head domain to form an ATP-sandwiched dimer is much weaker than that of similar domains isolated from other organisms. When ScpA is expressed alone, it forms insoluble aggregates. Interestingly, however, when ScpA and ScpB are expressed together, the two subunits form a soluble binary complex, and a soluble form of ScpA monomers is recovered in side fractions. Domain mapping experiments further suggest that ScpA undergoes a conformational change upon binding to ScpB, which may in turn contribute to the formation of an ScpAB-SMC-head ternary complex.

2. Condensins and chromosome architecture (T. Ono, and T. Hirano)

In higher eukaryotic cells, there exist two condensin complexes, known as condensin I and II. Both play essential yet distinct functions in the processes of mitotic chromosome assembly and segregation. Although the two complexes share structural similarities, their cell cycle dynamics and chromosomal distributions are distinct from each other. Moreover, condensin I and II distribute on the metaphase chromatid axis in a non-overlapping manner. To understand the molecular basis of condensin-mediated chromosome assembly, we have searched for potential factors that might contribute to the differential distribution of condensin I and II. We find that condensins I and II tend to be enriched in R-band and G-band regions, respectively, on metaphase chromosomes. On the other hand, it has long been known that G-band regions are replicated later in S phase and condense earlier in prophase, compared to R-band regions. This set of information allows us to propose the working hypothesis that condensin II may play a role in coordinating two distinct chromosome events, i. e., DNA replication in S phase and chromosome condensation in M phase. We are now attempting to test this idea by various molecular and cytological techniques.

3. Cell cycle-specific functions and regulation of condensins (N. Aono, K. Kinoshita, and T. Hirano)

Accumulating lines of evidence suggest that the condensin complex plays an important role not only in mitotic chromosome condensation but also in various interphase chromosomal functions. It remains unclear, however, whether two condensin complexes (condensin I and II) might have distinct functions during interphase and how the two complexes might be regulated differentially throughout the cell cycle. To address these questions, we have analyzed the functions and cell cycle dynamics of the two complexes in *Xenopus* egg cell-free extracts. Our results show that condensin II, but not condensin I, is required for the completion of DNA replication under stressed conditions. Our current efforts also start to uncover a novel phosphorylation-dependent mechanism by which condensin I is targeted to chromosomes in a mitosis-specific manner. We plan to explore this mechanism in greater details by using the cell-free extracts and other experimental systems including human tissue culture cells.

4. Regulation of condensin II function by MCPH1, a gene product whose mutations cause human microcephaly (D. Yamashita, and T. Hirano)

Primary autosomal recessive microcephaly is a neurodevelopmental disorder characterized by marked reduction in brain size and mental retardation. The *MCPH1* gene, one of the genes responsible for microcephaly, encodes a protein containing multiple BRCT (BRCA1 C-terminal) domains. Cells from *MCPH1* patient cells display a unique cellular phenotype with premature chromosome condensation in early G2 phase and delayed decondensation post mitosis. Our previous study showed that this phenotype is caused by misregulation of condensin II, but not of condensin I. To further understand how MCPH1 might regulate condensin II, we have characterized the properties of the two factors in human tissue culture cells. A series of immunoprecipitation assays using truncation mutants show that MCPH1 physically interacts with condensin II through its central domain. We are now testing how the interaction might be regulated during the cell cycle and how it might contribute to the regulation of condensin II's activity in vivo and in vitro. We are also planning to address the same set of questions by using *Xenopus* egg extracts in which more intensive biochemical and functional analyses can be designed.

5. The role of condensins in mammalian meiosis (J. Lee, and T. 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 to their partners, making bivalent chromosomes at metaphase I. At anaphase I, homologous chromosomes, but not sister chromatids, separate from each other. While the roles of two condensin complexes have been characterized extensively in mammalian somatic cells, it

is totally unknown whether what kinds of condensin subunits might be expressed in meiotic cells or how they might participate in meiotic chromosome functions. In this project, we aim to elucidate the role of condensins in meiotic chromosome architecture dynamics in mouse spermatocytes and oocytes. To this end, we have raised antibodies against all known subunits of mouse condensins. Immunofluorescent and immunoblotting analyses using somatic culture cells show that a subset of these antibodies is able to specifically recognize common or unique subunits of condensin I and II. We are now using these antibodies to investigate the expression pattern of each subunit in mouse meiotic tissues. We are also attempting to identify putative molecules that might associate with the condensin subunits specifically during meiosis.

6. Molecular basis of sister chromatid cohesion (K. Shintomi, and T. Hirano)

A recent series of numerous studies in various organisms has demonstrated that a multi-protein complex termed cohesin plays a central role in sister chromatid cohesion during mitosis and meiosis. Very little is known, however, about how it might work at a mechanistic level. To fully understand the molecular basis of sister chromatid cohesion, we have reconstituted holo- and sub-complexes of cohesin from its recombinant subunits by using the baculovirus expression system. We are now testing their behaviors and functions in *Xenopus* egg extracts, a powerful experimental system that is able to recapitulate the whole cohesion process *in vitro*. A series of experiments using mutant forms of the cohesin complex will allow us to learn how the ATPase cycle and its individual subunits might regulate its molecular actions. Another yet related aim of this project is to elucidate the functions of cohesin regulators, which have been implicated in cohesion establishment during S phase and cohesin release in M phase. Comprehensive analyses of this class of proteins by using various biochemical and immunological techniques combined with the egg extracts will help us establish a complete picture of sister chromatid cohesion during the cell cycle.

Staff

Head

Dr. Tatsuya HIRANO

Member

Dr. Takao ONO

Dr. Katsuhiko KAMADA

Dr. Kazuhisa KINOSHITA

Dr. Jibak Lee ^{*1}

Dr. Keishi SHINTOMI ^{*2}

Dr. Daisuke YAMASHITA ^{*1}

^{*1} Contract Researcher ^{*2} Special Postdoctoral Researcher

Visiting Member

Dr. Nobuki AONO (HFSP)