

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. 精製標品を用いた分裂期染色体の再構成 (新富、平野)

分裂期における染色体構築は、遺伝情報を正確に娘細胞に継承するために不可欠な過程である。長い研究の歴史にも関わらず、「一本のクロマチン繊維はどのようにして染色体内に折り畳まれているのか」「一体何種類のタンパク質がこの過程に関わっているのか」といった本質的な疑問に対する回答は得られていない。我々は、限られた種類の精製因子を用いて試験管内に染色体を再構成することができれば、これらの問題を解決するための有効な手段になりうると考え、カエル卵抽出液を用いた試験管内再構成系をモデルとするアプローチを開始した。我々は、まず、卵抽出液の代わりに、3種の主要な染色体構成タンパク質（コアヒストン、コンデンシンI、トポイソメラーゼII）の精製標品をあわせて染色体を作ることができるかを調べたが、この試みはうまくいかなかった。しかし、大変興味深いことに、この反応系に卵抽出液の粗分画フラクション（フラクションA）を加えると、染色体を再構成できるようになった。これらの結果は、フラクションAの中に染色体構築に必須の未同定因子Xが存在することを示すものである。現在、染色体再構成系の完成を目指し、カラムクロマトグラフィーによって因子Xの同定を進めている。

2. 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機能解析 (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にしてM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I複合体の発現・精製系の構築を試み、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）の再構成に成功した。これらの複合体をカエル卵細胞抽出液に導入することにより、特定のサブユニットの機能解析が可能となった。さらにタグ標識型組換え複合体を組み合わせた解析から、染色体構築過程における各種変異型複合体特有のふるまいが明らかになりつつある。今後、DNA・クロマチンのコンデンシンとの相互作用による構造変化に注目し、染色体構築におけるコンデンシンの分子活性の本質に迫りたい。

3. 2つのコンデンシン複合体の生化学的比較解析 (竹内、平野)

ほとんどの真核細胞には、コンデンシン I とコンデンシン II と呼ばれる 2 つのタンパク質複合体が存在し、分裂期染色体の構築に必須な役割をもつ。様々なアプローチから 2 つのコンデンシン複合体の細胞内機能の違いが明らかになりつつある一方で、その基礎となる分子メカニズムの理解は進んでいない。例えば、コンデンシン I は、ATP の加水分解を利用して 2 重鎖 DNA に正の超らせんを導入することが知られており、染色体構築の本質的な反応のひとつと考えられている。しかし、コンデンシン II がどのような分子活性を示すのかについては全く分かっていない。我々は、コンデンシン I と II をカエル卵抽出液から精製し、両者の分子活性が、どこまで共有されており、どこが異なるかを検証することを目指している。本年度は、まずコンデンシン II 特異的サブユニットに対する抗体を作製し、これを用いてカエル卵抽出液からコンデンシン II をアフィニティー精製することに成功した。既にコンデンシン I も精製するとともに種々の生化学的解析手法を確立しているため、来年度は精製したコンデンシン I と II の分子活性を徹底的に比較解析していく。さらに、組換え型コンデンシン複合体及びそのサブユニット欠失変異体を材料に加えることで、コンデンシン I と II の分子活性における各サブユニットの役割を明らかにしていきたい。

4. 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)

大変興味深いことに、多くのバクテリアにおいても、真核生物のコンデンシンによく似た複合体が存在し、それらは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、ホモ二量体を形成する SMC サブユニットと二種の制御サブユニット (ScpA と ScpB) から構成され、複製開始点近傍に結合するタンパク質を足場にして染色体にリクルートされる。SMC サブユニットは ATP 加水分解反応を担う領域 (ヘッドドメイン) を有し、制御サブユニットはヘッドドメインの二量化によって誘導される ATP 加水分解反応を制御している。我々は、ヘッドドメインの二量化における制御タンパク質の構造的役割と構造変化の可能性を調査するため、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。本年度は、制御サブユニットが結合した三者複合体を精製し、電子顕微鏡観察を行うことで、複合体分子の全体像と機能を俯瞰的に調査した。その結果、独立に安定な複合体を形成しうる ScpA と ScpB は、SMC 二量体の V 字状末端に存在する 2 つのヘッドドメインのうち一方のみに結合していることが明らかとなった。さらに、制御サブユニットに変異を導入したところ、この開いた全体構造が大きく変化した。この変異の導入によって SMC の ATP 加水分解活性も大きく変化することから、制御サブユニットの構造的変化が SMC 二量体会合に深く関わっていることを確認することができた。

5. 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)

多くの真核生物はコンデンシン I と II を持ち、それぞれをうまく使い分けていることが明らかになりつつある。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ているが、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 がどのような役割を果たしているのか、という基本的な問題の理解は進んでいない。我々はこれまでに、発生途上の大脳皮質においてコンデンシン I と II に共通するサブユニットが神経幹細胞の増殖と生存に必須であることを明らかにしている。本年度は、神経幹細胞においてコンデンシン I または II に特異的なサブユニットを除去したマウスを用い、それぞれの複合体の役割を解析した。その結果、コンデンシン I を除去した神経幹細胞では、分裂期染色体の形態に大きな異常は見られないものの、分裂期の進行に遅れが生じることが分かった。興味深いことに、コンデンシン II を除去すると分裂期染色体の形態に異常が生じるが、分裂期の進行には大きな影響を与えなかった。今後、このような対照的な表現型を生み出す原因を突き止め、神経幹細胞におけるコンデンシン I と II の固有の機能について理解を深めたい。

6. コンデンシン II による染色体複製と分離の連係機構の解析 (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あるいは染色体に局在し、コンデンシン I に先だって分裂期の早い時期から染色体凝縮に貢献する。我々は昨年度までに、コンデンシン II は複製した染色体領域を互いに引き離す作業 (姉妹染色分体の分割) を S 期の間から開始していることを示した。興味深いことに、弱い複製ストレスの存在下でコンデンシン II を除去すると、分裂期染色体の凝縮と分離により大きな異常が観察された。これらの解析から、コンデンシン II は染色体の複製と分離を連係するための鍵の因子のひとつであると考えられた。この連係をさらに深く理解するため、本年度は複製ストレスによって高頻度で分裂期染色体の断裂 (形態的には切断と識別される) が起こる染色体脆弱

部位（CFSs: common fragile sites）に注目して、コンデンシンIIの役割を明らかにしようと試みた。ヒト正常由来細胞（RPE-1）において複製ストレス存在下で発現しやすいCFSsを探索し、コンデンシンII除去細胞と対照細胞におけるCFSの断裂頻度を解析した結果、両者の間に大きな差異は認められなかった。現在、CFS以外の領域において、複製ストレス存在下で生じるDNA損傷の修復過程にコンデンシンIIが関与している可能性について検証を進めている。

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

Proper assembly of chromosomes is vital for their accurate transmission during mitosis. Despite intensive studies, it remains unknown how a chromatin fiber is folded within a chromosome or how many proteins are required for making a chromosome. To unlock these longstanding questions, we have sought to develop a biochemically tractable system in which a mitotic chromosome can be reconstituted from as few purified components as possible in a test tube. As an attempt to reproduce a chromosome assembly reaction achieved in frog egg extracts, we first incubated sperm DNA with three major chromosomal proteins (core histones, condensin I, and topoisomerase II). This attempt failed to work. However, when the reaction mixture was supplemented with a polyethylene glycol-precipitated fraction of the egg extract (fraction A), it became competent for chromosome assembly, indicating that the missing factor X resides in fraction A. We anticipate that identifying factor X will enable us to establish a complete system of chromosome reconstitution.

2. Reconstitution and functional analyses of recombinant condensin complexes (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 investigated. To this end, we established an experimental protocol for reconstituting condensin I from its recombinant subunits, and succeeded in purifying a wild-type holo-complex as well as a panel of sub-complexes lacking one or more of the regulatory subunits. These complexes were then subjected to chromosome assembly assays in frog egg extracts. Our analyses demonstrated that each non-SMC regulatory subunit makes a distinct contribution to condensin functions. Additional assays using differentially tagged, recombinant complexes allowed us to follow different behaviors of the wild-type and mutant versions of condensin I in the chromosome assembly reaction.

3. Comparative biochemical analyses of condensins I and II (Takeuchi, Hirano)

Most eukaryotes possess two different condensin complexes (known as condensins I and II). A series of recent studies have demonstrated that both complexes play fundamental but distinct roles in mitotic chromosome assembly and segregation. However, the molecular basis of their different functions is poorly understood. Although it was shown that purified condensin I introduces positive superhelical tension into double-stranded DNA in an ATP-hydrolysis-dependent manner, it remains unknown whether the same activity is shared with condensin II. In this project, we aimed to elucidate the biochemical properties of condensin II and to critically compare them with those of condensin I. During the past year, we successfully purified condensins I and II from frog egg extracts by affinity chromatography. We are now analyzing the purified complexes with a variety of biochemical assays including DNA binding, DNA supercoiling and ATP hydrolysis assays. In addition to the native condensin complexes, we also plan to extend our assays using recombinant complexes. Biochemical analyses using sub-complexes lacking one or more subunits will give us deeper knowledge on the specific function of each subunit.

4. Molecular and structural analyses of the bacterial condensin complex (Kamada, Hirano)

Most prokaryotes have a condensin-like complex that plays an essential role in the organization and segregation of the nucleoid. The prokaryotic condensin complex is composed of an SMC homodimer and two auxiliary proteins known as ScpA and ScpB, and is recruited to origin-proximal regions of duplicated chromosomes. The SMC dimer has two ATP-binding head domains, and their engagement-driven ATP hydrolysis is controlled by the ScpAB subcomplex. To understand the structural basis of SMC ATPase activation, we have used recombinant subunits derived from a thermophilous bacterium. As judged by electron microscopy, a full complex of SMC-ScpAB displayed an asymmetric configuration in which the ScpAB subcomplex is bound to only one end of the V-shaped SMC homodimer. Introduction of mutations into ScpAB changed the overall architecture of the full complex and also affected the kinetics of the ATPase activity, further confirming that internal structural changes of the ScpAB subcomplex control the engagement of the SMC head domains.

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

Most eukaryotes utilize two different condensin complexes (known as condensins I and II). It has been reported that condensin II 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. We had shown previously that a subunit common to both condensins I and II is essential for proliferation and survival of neural stem cells (NSCs) at the developing cerebral cortex. During the past year, we depleted specific subunits of condensins I and II by using conditional knockout mice. Depletion of condensin I or II caused a similar level of proliferation defects, but that the observed defects were less severe than that observed in depletion of both condensins. NSCs depleted of condensin I displayed a delay in mitosis, even though chromosome shapes were not prominently affected. On the other hand, loss of condensin II functions led to abnormal chromosome architecture without an apparent impact on mitotic progression. We now plan to dissect the differential phenotypes and to further clarify both overlapping and non-overlapping functions of condensins I and II.

6. 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 condensation in prophase. We demonstrated previously that condensin II initiates sister chromatid resolution as early as in S phase. Interestingly, application of mild replicative stress exacerbated defects arising from condensin II depletion, suggesting that condensin II is a critical factor linking chromosome duplication to segregation. To further address the molecular mechanism linking the two processes, we have focused on common fragile sites (CFSs), chromosomal regions that frequently display chromatid breakages in the presence of replicative stress. We first searched for CFSs that are most suitable for analyses in human RPE-1 cells, and then measured the frequency of chromatid breaks at CFSs in

cells depleted of condensin II. It was found, however, that loss of condensin II functions does not have a big impact on the frequency of chromatid breaks. We now plan to test whether condensin II might be involved in repair processes of DNA damages at non-CFSs.

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
竹内 康造 Kozo Takeuchi

Technical Staff

松浦 明子 Akiko Matsuura

Assistant

有光 いずみ Izumi Arimitsu

Part-timer

山田 直子 Naoko Yamada
小林 奈保美 Naomi Kobayashi