

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、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（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。

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分裂期染色体の構築を担っているのか、という本質的な問題に対する理解はいまだ乏しい。我々は、組換えサブユニットを用いた機能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。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2つのnon-SMC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、さらにもう1つのnon-SMCサブユニットであるkleisinサブユニットに点変異を導入した変異型ホロ複合体を用いて解析を進めた結果、kleisinサブユニットと2つのHEATサブユニットとの機能的連関が見出された。今後、これら3つのnon-SMCサブユニットの協調的な作用メカニズムに注目することにより、染色体軸構造の形成に必須なコンデンシンの分子活性の本質に迫りたい。

可逆的再組織化アッセイを用いた染色体軸の解析 (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、ともに姉妹染色分体の縦軸に集中して局在する。この染色体軸は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であろうか？興味深いことに、単離した染色体を高濃度の塩で処理すると、ヒストンは除去されるにもかかわらず、コンデンシンを含む軸様構造は異常に凝集した形態をとって染色体内に残存することが知られている。こうした背景から、染色体構築におけるコンデンシンの役割を解明するためには染色体軸の物理化学的特性の理解を深めることが必要であると、我々は考えた。そこでまず、溶媒環境を操作することによりクロマチン形態と染色体軸構造を可逆的に変化させる実験系（可逆的再組織化アッセイ）を確立した。この実験系では、低塩濃度で膨潤させた染色体を異なる塩濃度のバッファーに戻すことによって、塩濃度に応じて特徴的な「再組織化」を誘導することが可能である。この過程で元の形態に近い染色体を再組織化するためには、コンデンシン（特にコンデンシン II）に依存した適切な軸の形成が必須であることを見いだした。一方、再組織化におけるトポイソメラーゼ II の貢献は軽微であった。今後、この実験系を発展させ、染色体軸の物理化学的特性という新たな視点から、

染色体構築におけるコンデンシンの分子機能を探求していきたい。

染色体構築におけるヒストンの役割の解明（新富、平野）

分裂期染色体を構成するタンパク質のうち最も大量に存在するのはヒストンであり、その質量は全染色体結合タンパク質量のおよそ半分を占める。しかし、染色体構築においてヒストンがどのような役割を果たすのかという本質的な問題については、これまで十分に検討されてこなかった。我々は、この問題を解明するために、ヒストンをほとんど含まないマウスの精子クロマチンを基質としてカエル卵抽出液中で染色体を作る実験系を考案した。この実験系では、ヒストンやコンデンシンなど卵由来のタンパク質が精子クロマチンに取り込まれるが、ヒストンシャペロン *Asf1* を卵抽出液から除いておくとヒストンの取り込みが完全に阻害された。しかし大変驚くべきことに、この条件下においても染色体に似た構造が形成された。クロマチンは全体として凝縮度が低く不鮮明な形状を示すものの、その内部には DNA 結合試薬で強く染色される明瞭な軸が観察された。コンデンシン II はもっぱら軸に集中しているのに対し、コンデンシン I は軸に加えてその周囲のクロマチンループにも検出された。今後、この新たな実験系をさらに洗練することにより、染色体構築におけるヒストンと二種類のコンデンシンの機能的な相互作用についての知見を深めていきたい。

クロマチンを基質としたコンデンシンの機能解析（竹内、平野）

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し、染色体構築に貢献すると考えられている。しかし、これまでの機能解析は主に裸の DNA を基質としており、コンデンシンがいかにしてクロマチン基質に作用するのかについてはよく分かっていない。我々はこの問題にアプローチするために、操作が容易であり、かつ細胞内に近い環境で形成されたクロマチン基質を使った実験系の確立を目指した。裸の環状 DNA を分裂期の卵抽出液とインキュベートすると、ヌクレオソームを基盤とした「ミニ染色体」と呼ばれる構造が形成される。これまでに、このミニ染色体のタンパク質組成が精子クロマチンを基質として形成した染色体のそれとよく一致することを見出すとともに、卵抽出液内でミニ染色体に対するコンデンシンの結合を解析する実験系を構築してきた。本年度は、ショ糖密度勾配遠心により卵抽出液からミニ染色体を精製するにより、試験管内でミニ染色体に対するコンデンシンの結合を解析できる実験系を構築した。これらの新たな実験系を組み合わせることで、裸の DNA や精子クロマチンを基質とした実験系では得られなかった、より詳細なコンデンシンの分子メカニズムの理解が可能になると期待される。

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、真核生物のコンデンシンによく似た複合体が染色体の構造維持と分離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タンパク質に依存して染色体にリクルートされるが、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サブユニットと二種の制御サブユニットから構成される。棒状構造をとる SMCサブユニットは、その一端に ATP 加水分解反応を担う領域（ヘッドドメイン）をもち、反対側の末端で互いに結合することにより V 字型のホモ二量体を形成する。制御サブユニットは片方のヘッドドメインに結合し、ホロ複合体が構築される。複合体の電子顕微鏡観察の結果、制御サブユニットにある変異を導入すると、その全体構造が大きく変化することがわかった。すなわち、この変異による制御サブユニットの構造変化が、複合体全体の構造に大きな影響を与えるらしい。現在、この変異が細胞内におけるサブユニット間相互作用に与える影響を検討するとともに、加水分解反応サイクルにおける制御サブユニットの構造学的・酵素学的役割を調査している。

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, 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. 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.

Functional analyses of recombinant condensin complexes in vitro (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 assembly. Condensins I and II 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 had 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 functional assays using frog egg extracts in which mitotic chromosomes can be assembled in vitro. Our results demonstrated that balancing acts of two non-SMC subunits containing HEAT repeats support dynamic assembly of chromosome axes. During the past year, we have introduced a panel of point mutations into the kleisin subunit of condensin I, and obtained evidence for physical and functional interactions between the kleisin subunit and the two HEAT subunits. We now plan to address the molecular basis of chromosome axis formation by further exploring cooperative actions of the three non-SMC subunits.

In situ physicochemical analyses of condensin-based chromosome axes (Ono, Hirano)

Condensins I and II are multiprotein complexes that play a central role in mitotic chromosome assembly and segregation. As judged by immunofluorescence microscopy, both complexes are concentrated along the internal axial region of each chromatid. It is not fully understood, however, how the condensin-enriched chromosome axes are formed and contribute to the assembly of mitotic chromosomes. Classical studies had shown that, when isolated chromosomes were exposed to a high-salt buffer, axial structures containing condensins formed proteinaceous aggregates, known as chromosome scaffolds. These observations prompted us to re-examine the physicochemical properties of chromosome axes in a systematic approach. To this end, we established a set of experimental protocols for inducing reversible changes of chromosome morphology in situ. In this setup, swollen chromosomes produced in a low-salt buffer could be "reorganized" by returning them

to buffers containing different concentrations of salt. We found that the reorganization of chromosome axes, which depends on condensins (especially condensin II), makes a crucial contribution to the restoration of overall morphology of chromosomes. In contrast, apparent contribution of topoisomerase II to this reorganization process was small if any. We now plan to extend this experimental system to understand the mechanism of mitotic chromosome assembly in the context of physicochemical properties of condensin-based chromosome axes.

Elucidation of histones' contribution to chromosome assembly (Shintomi, Hirano)

Although histones account for roughly half weight of all proteins associated with mitotic chromosomes, their potential roles in mitotic chromosome assembly remain largely unexplored. To address this fundamental question, we established a new cell-free assay combining frog egg extracts and mouse sperm chromatin devoid of histones. When they were mixed together, histones and other chromosomal proteins including condensins were recruited from the extract to the chromatin, eventually producing mitotic chromatids *in vitro*. We found that depletion of the histone chaperone Asf1 from the extracts completely impaired histone deposition reactions. Surprisingly, however, the resulting histone-free chromatin displayed chromatid-like structures with DAPI-dense discrete axes surrounded by hazy chromatin loops. In these highly characteristic structures, condensin II localized exclusively along the axes, whereas condensin I was distributed both along the axes and on chromatin loops. Our cell-free assay established here will be useful for studying how crosstalk among histones and two condensins controls the organization of axes and loops within mitotic chromatids.

Functional analyses of condensins using chromatin templates (Takeuchi, Hirano)

Condensins are multisubunit protein complexes that play fundamental roles in mitotic chromosome assembly and segregation. Although it had been demonstrated that purified condensin I has the ability to introduce positive superhelical tension into double-stranded DNA (dsDNA) in an ATP-hydrolysis-dependent manner, it remains unknown how the corresponding activity might act on nucleosomal DNA. To address this question, we sought to use minichromosomes (small chromatin-like structures assembled on closed circular dsDNA) as a substrate for condensins. We established an experimental protocol for isolating minichromosomes assembled in frog egg extracts, and demonstrated that isolated minichromosomes share many biochemical properties with those of sperm chromatin-derived chromatids assembled in frog egg extracts. During the past year, we have further refined the experimental protocols so that minichromosomes could be used as a substrate for a condensin-binding assay *in vitro*. We anticipate that this experimental assay will be powerful in dissecting the molecular action of condensins on chromatin templates at an unprecedented level.

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

The maintenance of the genome DNA in prokaryotes requires many nucleoid-associated factors. Among them, a condensin-like complex, which is recruited to the origin-proximal region, plays a key role in the organization and segregation of the nucleoid. This complex (often referred to as bacterial condensin) is composed of an SMC homodimer and a regulatory subcomplex containing two other subunits. The SMC dimer is a V-shaped molecule with an ATP-binding head domain at each distal end, and the regulatory subcomplex binds to one of the head domains. As judged by electron microscopic analysis, introduction of certain mutations into the regulatory subunits changed the overall architecture of the full complex, indicating that internal structural changes of the subcomplex make a crucial contribution to determining the shape of the full complex. We now plan to investigate the mode of subunit-subunit interactions *in vivo* by expressing the corresponding mutant subunits in bacterial cells, and to further analyze structural and enzymatic roles of the regulatory subunits in the ATPase cycle 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 Fellows

西出 賢次 Kenji Nishide
竹内 康造 Kozo Takeuchi
田根 将志 Shoji Tane

Technical Staff

松浦 明子 Akiko Matsuura

Assistant

有光 いずみ Izumi Arimitsu

Part-timer

小林 奈保美 Naomi Kobayashi
井上 正美 Masami Inoue