

## Chromosome Dynamics Laboratory

主任研究員 平野 達也 (理博)  
HIRANO, Tatsuya (Ph.D.)



### キーセンテンス：

1. 染色体構築と分離の謎を探る
2. SMCタンパク質複合体の分子メカニズムを解明する
3. 染色体ダイナミクスの異常を伴う遺伝疾患を理解する

### キーワード：

細胞生物学、有糸分裂、減数分裂、染色体凝縮、染色体分離、コンデンシン、コヒーシン、SMCタンパク質

### 研究目的

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. コンデンシンの分子構造生物学 (鎌田、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は、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。ScpAはN末端、中央、C末端の三つの領域から構成される。そのC末端領域はヘッド・ドメインと相互作用し、N末端から中央にかけての領域はScpBと強固に結合した。しかしScpBの非存在下では、ScpAのC末端領域は自身の中央領域と自己会合し、ヘッド・ドメインと安定に結合することができなかった。このことから、ScpBはScpAの分子内構造変化を制御することにより、コンデンシン複合体の形成と解離の制御に大きな役割を果たしていると考えられた。

#### 2. コンデンシンの染色体分布を規定する因子の同定 (小野、平野)

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。2つの複合体は構造的によく似ているが、細胞周期の過程で互いに異なる制御を受けている。すなわち、コンデンシンIが間期で細胞質に局在し、核膜が崩壊した後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、早い時期の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複せず、コンデンシンIIはG-バンド領域に集中する傾向がみられた。G-バンド領域はS期の遅い時期に複製され、分裂期にはいると逆に早い時期から凝縮を開始することが知られている。そこで我々は、染色体複製と凝縮という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。これまでの解析の結果、HeLa細胞において染色体の複製と同期してコンデンシンIIの核内の動態が変化していることが見いだされた。コンデンシンIIとDNA複製がどのような関係にあるのかをさらに明らかにするため、現在細胞生物学的手法を駆使して解析を進めている。

#### 3. コンデンシンの細胞周期制御 (木下、平野)

高等真核細胞においてコンデンシンIとIIは共に正常なM期染色体凝縮に必須な役割を果たしているが、両者は細胞周期進行において異なる細胞内分布・局在変化を示す。この二つのコンデンシン複合体

の細胞内局在の違いは各々のコンデンシンに特異的なnon-SMCサブユニットによって生み出されていると考えられるが、その分子機構は未解明のままである。我々はコンデンシンのnon-SMCサブユニットに特に注目し、カエル卵抽出液を用いてこれらのサブユニットのクロマチン結合能を解析するアッセイ系を開発した。このアッセイ系を用いてM期特異的にクロマチンと相互作用するサブユニットを同定した。またヒト培養細胞系において、M期特異的なタンパク質キナーゼCdc2によるリン酸化の標的部位における変異がそのM期クロマチン結合能に影響を及ぼすことを明らかにした。今後さらにコンデンシンIとIIの細胞周期特異的な挙動と機能を生み出す分子機構の詳細について解明を進める予定である。

#### 4. コンデンシンII複合体の制御因子MCPH1の解析（山下、平野）

我々は、MCPH1と呼ばれるタンパク質の働きに焦点を当て、コンデンシンIIの細胞周期制御について解析を進めている。MCPH1は小頭症（*microcephaly*）の原因タンパク質の1つであり、このタンパク質に変異を持つ患者由来の細胞では分裂期に先立って時期尚早な染色体凝縮が観察されることが知られていた。その後の解析により、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、MCPH1はコンデンシンIIの抑制因子として働いている可能性が示された。我々は、ヒト培養細胞抽出液を用いた免疫沈降実験により、MCPH1とコンデンシンIIが物理的に相互作用していることを見出した。さらに無細胞翻訳系で発現させた組み換えタンパク質を用いた解析により、両者の相互作用ドメインの同定に成功した。カエル卵抽出液を用いた解析を行った結果、興味深いことに、コンデンシンIIの染色体結合においてMCPH1が重要な役割を担っていることがわかった。現在、このMCPH1によるコンデンシンIIの制御機構の詳細を解明すべく、解析を進めている。

#### 5. 哺乳類減数分裂におけるコンデンシンの役割（李、平野）

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有な動きを示す。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は二価染色体が形成され、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対して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、作製したマウスのコンデンシンの抗体を用いて、主に蛍光免疫染色法により、コンデンシンIとIIの動態を調べた。その結果、マウスの卵母細胞において、コンデンシンIとIIはともに減数分裂過程を通して発現しているが、両者の染色体上への局在化は時間的にも空間的にも異なる制御を受けていることが示された。現在、このような減数分裂におけるコンデンシンの特異的な制御がどのような意味をもつのかを調べる目的で、抗体の卵母細胞への顕微注入による機能阻害実験を試みている。

#### 6. 姉妹染色分体接着の分子メカニズム（新富、平野）

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る。後生動物では分裂前期に大部分のコヒーシンが染色体腕部から解離し、二本の姉妹染色分体が識別できるようになる。この過程は姉妹染色分体の分割と呼ばれ、後期に染色分体を同調的に分配するために必要であると考えられている。我々は、姉妹染色分体の分割を引き起こすメカニズムを検討するために、カエル卵抽出液を用いて解析を行った。コヒーシン制御因子Waplを卵抽出液から除去すると分割が著しく阻害されたが、ヒトWapl組換えタンパク質を分裂期移行時に加えることによってその異常を相補できることを見出した。また、同様の方法により接着の安定化に寄与すると考えられてきたPds5も分割に必要であることが示された。さらに、脊椎動物のWaplのN末端に保存された特徴的なモチーフ（FGFモチーフ）がPds5やコヒーシンとの物理的相互作用を促進し、染色分体分割に重要な役割を果たすことが明らかになった。以上の結果は、WaplとPds5が誘導するコヒーシン複合体のコンフォメーション変化によって、その染色体からの解離が促進される可能性を示唆するものである。

#### Key Sentences:

1. To unlock the secret of chromosome architecture and segregation
2. To elucidate the molecular mechanisms of SMC protein complexes

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

#### **Key Words:**

cell biology; mitosis; meiosis; chromosome condensation; chromosome segregation; condensin; cohesin; SMC proteins

#### **Purpose of Research :**

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 molecular biology of the condensin complex (Kamada, Hirano)**

In eukaryotic cells, the condensin complex consists of two SMC catalytic subunits and three non-SMC regulatory subunits. In 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 structural basis of action of SMC proteins, we have used the *Bacillus subtilis* condensin complex as a model system. ScpA is composed of three regions, namely, the N-terminal, central and C-terminal regions. The C-terminal region of ScpA directly binds to the head domain of SMC and the rest associates tightly with ScpB. In the absence of ScpB, however, the C-terminal region of ScpA tends to associate with its own central region, thereby failing to associate with the SMC head domain. This result suggests that the binding of ScpB induces an internal conformational change of ScpA, which may in turn play an important role in the formation and dissociation of the ScpAB-SMC complex.

#### **2. Condensins and chromosome architecture (Ono, Hirano)**

Vertebrate cells possess two different condensin complexes, known as condensin I and II. Both play essential yet distinct functions in the processes of mitotic chromosome assembly and segregation. Condensin I is sequestered into the cytoplasm from interphase through prophase and gains access to chromosomes only after the nuclear envelope breaks down in prometaphase. In contrast, condensin II is predominantly nuclear during interphase and contributes to early stages of chromosome assembly in prophase. In metaphase chromosomes, condensin II tends to be enriched in G-band regions. It has long been known that G-band regions are replicated late in S phase and condense early within the prophase nucleus. This set of information allows us to propose the working hypothesis that condensin II may play a role in linking DNA replication in S phase to chromosome condensation in M phase. To test this hypothesis, we have examined the dynamics of condensin II during interphase in great details. We find that nuclear condensin II is readily extractable with a detergent-containing buffer in G1 cells, but not in G2 cells. Furthermore, a synchronization experiment shows that the non-extractable population of condensin II increases in parallel with the progression of S phase. These results suggest that condensin II may start to associate with chromatin during S phase long before chromosome condensation initiates. Currently, we are attempting to extend these observations to get further insights into the functional relationship between DNA replication and chromosome condensation.

#### **3. Cell cycle regulation of condensins (Kinoshita, Hirano)**

In higher eukaryotic cells, the two condensin complexes (condensin I and II) share an essential role in the process of proper mitotic chromosome condensation. However, the spatial and temporal distributions of the two complexes are differentially regulated during the cell cycle. Condensin II is predominantly nuclear during interphase and displays clear localization on chromosomes in prophase. In contrast, condensin I is enriched in the cytoplasm from interphase through prophase

and gets access to chromosomes just after the nuclear envelope breaks down in prometaphase. It still remains unclear, however, how the two complexes might be regulated differentially throughout the cell cycle. To address this question, we have developed an assay for testing the ability of condensin subunits to bind chromatin in a cell cycle-specific manner in *Xenopus* egg extracts. This approach allows us to identify condensin subunits that interact with mitotic chromosomes. We plan to further explore the molecular mechanisms of the cell cycle-dependent behavior and function of the condensin complexes.

#### **4. Regulation of condensin II by MCPH1, a gene product whose mutations cause primary microcephaly (Yamashita, Hirano)**

Primary autosomal recessive microcephaly is a neurodevelopmental disorder characterized by marked reduction in brain size and mental retardation. Cells from patients carrying mutations in *MCPH1* gene, one of the genes responsible for microcephaly, display a unique cellular phenotype with premature chromosome condensation in early G2 phase. 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 various experimental systems. Immunoprecipitation assays using extracts from human tissue culture cells show that MCPH1 physically interacts with condensin II. In vitro protein-protein interaction assays using recombinant proteins synthesized in cell-free translation system allow us to refine specific interacting domains in each factor. Finally, experiments using *Xenopus* egg extracts show that MCPH1 may have a crucial role in chromosome loading of condensin II. We are planning to extend these observations by using a series of truncations and point mutants of MCPH1.

#### **5. The role of condensins in mammalian meiosis (Lee, 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 with each other, 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 remains unknown whether which 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 and dynamics in mouse germ cells. To this end, we have performed immunofluorescent staining in in-vitro-cultured mouse oocytes using the antibodies raised against mouse condensin subunits. We find that both condensin I and II are expressed in mouse oocytes throughout meiosis, but the loading of each complex onto the chromosomes is distinct both spatially and temporarily. To understand the biological significance of the meiosis-specific regulation of condensin dynamics, we are now attempting to disturb condensin functions by means of microinjection of specific antibodies.

#### **6. Molecular mechanisms of sister chromatid resolution (Shintomi, Hirano)**

The cohesin complex establishes sister chromatid cohesion during S phase. In metazoan cells, most if not all cohesin dissociates from chromatin during mitotic prophase, leading to the formation of metaphase chromosomes with two cytologically discernible chromatids. This process, known as sister chromatid resolution, is thought to be an essential prerequisite for synchronous separation of sister chromatids in subsequent anaphase. To dissect this process at a mechanistic level, we have set up an *in vitro* system. Sister chromatid resolution is severely impaired upon depletion of Wapl from *Xenopus* egg extracts. Remarkably, exogenously added human Wapl can rescue these defects in a very short time window of early mitosis. A similar set of observation is made for Pds5, a protein previously implicated in the stabilization of cohesion. Extensive protein-protein interaction assays combined with the egg extracts reveal that characteristic amino-acid motifs (the FGF-motifs) conserved in the N-terminal half of Wapl coordinate its exquisite interaction with Pds5 and regulatory subunits of cohesin, and play crucial roles in promoting sister chromatid resolution. These results suggest that Wapl and Pds5 directly modulate conformational changes of cohesin to make it competent for dissociation from chromatin during prophase.

***Head***

平野 達也      Tatsuya Hirano

***Members***

鎌田 勝彦      Katsuhiko Kamada

木下 和久      Kazuhisa Kinoshita

李 智博      Jibak Lee

松浦 明子      Akiko Matsuura

小野 教夫      Takao Ono

山下 大輔      Daisuke Yamashita

***Special Postdoctoral Researchers***

新富 圭史      Keishi Shintomi

***Assistant and Part-timer***

有光 いずみ      Izumi Arimitsu

高橋 匠      Takumi Takahashi