

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（カエル卵抽出液・培養細胞・卵母細胞・紅藻細胞・バクテリア）と多角的なアプローチ（生化学・細胞生物学・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。

ヌクレオソームとコンデンシンの機能的相互作用（新富）

分裂期染色体はヌクレオソームを基本構造単位とするクロマチン繊維が折り畳まれた構造である。これまでの研究によってコンデンシンが染色体構築に中心的な役割を果たすことが明らかにされているのに対し、ヌクレオソームがこのプロセスにどのように関与するのかについては十分に検討されてこなかった。そこで、我々は、ヒストンをほとんど含まないマウス精子核とカエル卵抽出液を組み合わせ、試験管内で染色体構築プロセスを再現するプロトコルを確立した。この無細胞系においてヒストンシャペロンAsf1を除去すると、ヒストンのDNA上へのローディングが阻害され、ヌクレオソームを含まない染色体様構造が作られることを見出した。さらに、Asf1と2種類のコンデンシンを様々な組み合わせで除去する実験によって、コンデンシン I が正常に機能するためには、ヌクレオソームによるクロマチンループの組織化とコンデンシン II による染色体軸の形成が不可欠であることが示された。現在、ヌクレオソームとコンデンシンの機能的相互作用をさらに詳細に理解するために、（カエル卵抽出液の代わりに）精製タンパク質を用いてマウスの精子核から染色体を再構成することのできる実験系の確立を目指している。

組換えサブユニットから再構成したコンデンシン I 複合体の機能解析（木下）

真核生物のコンデンシン I 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構成される。我々はこれまでに、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してきた。そして、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リポートを有する二つの制御サブユニットの拮抗的な作用が染色体の軸構造の形成に必須であることを明らかにした。さらに、もう一つの制御サブユニットである kleisin サブユニットについても解析を進め、特にモチーフIIIと呼ばれる領域に変異を導入したホロ複合体が極めて特徴的な染色体構造異常を示すことを見出している。本年度は、このモチーフIII変異型複合体に注目し、変異体の表現型と kleisin サブユニットの機能をより深く理解するための手法の開発に取り組んだ。その結果、基質DNAの状態を変化させることによって、野生型と変異型複合体の機能の違いが特に強調されて検出されるアッセイ系を確立することができた。またこれまで用いてきた精子核由来の基質に加え、より単純な精製DNAを基質に用いて変異型複合体の活性を検出できることを見出した。今後これらの実験系を用いて、kleisinサブユニットがいかにしてHEATサブユニットと協調

しながらコンデンシン I の機能に寄与するのか、そのメカニズムを明らかにしていきたい。

コンデンシン I の活性化における CDK1 の役割 (田根)

コンデンシン I は、染色体構築過程において中心的な役割を果たすタンパク質複合体である。我々のグループではこれまでに、分裂期キナーゼ CDK1 によるコンデンシン I のリン酸化が染色体再構成に必要な十分なタンパク質修飾であることを示してきた。しかし、コンデンシン I のどのサブユニットのどの部位が CDK1 によってリン酸化されるのか、そして個々のリン酸化反応がコンデンシン I の機能をどのように制御しているのか、という問題は十分に理解されていない。我々はまず、コンデンシン I サブユニット内にある計 10 ヶ所の CDK1 リン酸化候補部位をアラニン置換したホロ複合体 (10A 変異体) を発現・精製した。そして、内在性コンデンシンを除いたカエル卵抽出液へこの 10A 変異型複合体を添加し、それが引き起こす染色体形態の異常について観察を行った。その結果、10A 変異型複合体を用いて形成された染色体には、野生型と比べてわずかな形態異常しか観察されなかった。ただし、現在手にしている精製複合体には若干の技術的懸念が生じているので、その解消を目指す努力を続けている。今後、分裂期染色体形成におけるコンデンシンのリン酸化の詳細な機能制御を理解するために、他の候補部位にも対象を広げ詳細な解析を進めていく予定である。

組換えサブユニットから再構成したコンデンシン II 複合体の機能解析 (香西)

真核生物のゲノム DNA は細胞周期を通じてその構造を大きく変化させる。有糸分裂期には、クロマチン DNA は極度に凝縮することで、姉妹染色分体として棒状の姿を現す。この染色体凝縮の過程は細胞分裂を成功させるために必要不可欠なプロセスの一つであり、この過程において主要な役割を果たしているのがコンデンシン複合体である。コンデンシン I のサブユニットの機能が次第に明らかになりつつあるが、コンデンシン II のサブユニットの機能についての解析は乏しい。分裂期におけるコンデンシン II による染色体の凝縮過程を詳しく理解するため、今年度我々は、哺乳類型のコンデンシン II 組換え複合体を調整し、カエル卵抽出液を用いた染色体再構成系に導入した。その結果、精製した組換え型複合体が、その添加量に応じて染色体形態を変化させる能力を有することを見出した。今後、制御サブユニットを欠いたコンデンシン II 複合体を調整することで、特定のサブユニットの機能解析を進める予定である。また、哺乳類のコンデンシン II の野生型および変異型複合体をコンデンシン I と同時に加え、コンデンシン I の染色体凝縮機能にどのように作用するのか調べることによって、染色体凝縮における 2 つのコンデンシンの協調機構を詳しく明らかにしたい。

間期核クロマチンの組織化におけるコンデンシン II の役割 (小野)

コンデンシン I と II は、分裂期染色体の構築において中心的な役割をもつタンパク質複合体である。このうち、コンデンシン II は間期から核に局在しており、分裂期に入る前から姉妹染色分体の分割を開始している。さらに最近、ヒトを含む複数の培養細胞株において、コンデンシン II の除去が間期核内におけるクロマチンの膨潤化や核の形態異常を引き起こすことが報告され、コンデンシン II は間期核クロマチンのグローバルな組織化に貢献することが示唆されている。しかし、観察された異常がコンデンシン II の間期特異的な働きの欠損によるのか、コンデンシン II を除去したことによって起こる分裂期染色体の構造異常や分離異常を介したものなのかは不明である。そこで我々は、コンデンシン II 特異的なサブユニットに Auxin-inducible degron (AID) 配列を組み込むことによって、コンデンシン II 複合体を迅速に分解できるヒト培養細胞をもちいて解析を進めている (今本研究室との共同研究)。現在までに、この AID 法と同調培養法を組み合わせることによって、特定の細胞周期のステージ内でコンデンシン II を除去できるシステムを構築した。今後、間期特異的なコンデンシン II の除去が、核形態とクロマチン構造にどのような影響を及ぼすのかを詳細に解析する予定である。

SMC 様ドメインを含む遺伝子発現制御に関与する複合体の分子解析 (鎌田)

真核生物のゲノム DNA は、ヒストンを介したクロマチンと呼ばれる基盤構造を形成しており、そこへ、転写因子や転写装置を呼び込むことによって、活発な遺伝子発現を誘導する。その一方で、細胞周期に応じて、遺伝子発現が不活性な領域ではヘテロクロマチン構造をとる。不活性化型クロマチンへの変換は、DNA からの一次転写産物が断片化された後、小さな RNA 分子と相補的な配列をもつ DNA 領域において、シトシンのメチル化によって誘導される。近年、このような RNAi 様因子と転写装置を媒介するが数多くの因子が同定され、それらが遺伝子発現制御に重要であることがわかってきた。DNA のメチル化を誘導する RdDM (RNA-dependent DNA methylation) 機構に関与する複合体には、真核生物の染色体凝縮に関わる SMC 蛋白質のヒンジドメインをもつサブユニットが見つかって

いる。興味深いことに、この蛋白質のパートナーとして、ATP エネルギー駆動型のドメインを持つ蛋白質も見つかっているが、これらの分子的機能や構造的基盤は明らかになっていない。我々は、この複合体に関与するサブユニット間の相互作用を分子生物学的に明らかにすることで、遺伝子発現調節機構と染色体凝縮にまたがる蛋白質の機能的収斂性と差違を理解することを目的としている。

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
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. In particular, we are interested in dissecting the structure and function of a highly-conserved class of large protein complexes, known as condensins, that play central roles in these processes. Many eukaryotic cells have two different condensin complexes (condensins I and II) that are subjected to differential cell cycle regulation and have both overlapping and non-overlapping functions. The two complexes share a heterodimeric pair of SMC (structural maintenance of chromosomes) ATPase subunits, and contain different sets of non-SMC regulatory subunits. Our laboratory takes multidisciplinary approaches (biochemistry, cell biology, genetics and structural biology) to understanding how condensins might work at a mechanistic level both in vitro and in vivo.

Functional crosstalk between nucleosomes and condensins (Shintomi)

The nucleosome is the fundamental structural unit of eukaryotic chromatin. During mitosis, duplicated nucleosome fibers are folded into a pair of rod-shaped chromatids to assemble a chromosome. While accumulating lines of evidence underscore the paramount importance of condensins I and II in building mitotic chromatids, it remains to be determined how nucleosomes contribute to this process. To examine this question, we established an in-vitro chromatid assembly protocol in which mouse sperm nuclei devoid of histones were incubated with mitotic extracts of frog eggs. In this cell-free assay, depletion of the histone chaperone Asf1 completely impaired histone deposition on the sperm DNA, resulting in formation of less-compacted nucleosome-free chromatids. Combinatorial depletion experiments indicated that proper actions of condensin I relied on nucleosome-dependent chromatin loop compaction and condensin II-mediated chromatid axis formation. To further understand the functional crosstalk between nucleosomes and condensins, we now plan to reconstitute chromatids starting from mouse sperm nuclei by using a minimum set of purified proteins instead of crude egg extracts.

Functional analyses of recombinant condensin I complexes in vitro (Kinoshita)

The eukaryotic condensin I complex is composed of a pair of SMC ATPase subunits and three non-SMC regulatory subunits. By combining recombinant condensin I complexes (either wild-type or mutant complexes) and frog egg extracts in which mitotic chromosomes can be assembled in vitro, we previously demonstrated that balancing acts of two regulatory subunits containing HEAT repeats support dynamic assembly of chromosome axes. We also examined the role of the kleisin subunit, another regulatory subunit of condensin I, and discovered that a holocomplex harboring point mutations in one of the kleisin's conserved subdomains, called "motif III", produced an unprecedented defective phenotype in chromosome assembly. During the past year, we have succeeded in setting up an experimental condition where the functional differences between the wild-type and motif III mutant complexes are detectable more readily than the conventional condition. We also found that naked DNA could be used as substrates for functionally dissecting the mutant complexes. We now plan to further clarify the molecular mechanisms of how the kleisin subunit contributes to condensin I function through its cooperation with the HEAT subunits.

Roles of CDK1 phosphorylation of condensin I in mitotic chromosome assembly (Tane)

Condensin I is a five-subunit protein complex that plays a central role in mitotic chromosome assembly. Previous studies from our laboratory had demonstrated that CDK1 phosphorylation of condensin I is the major post-translational modification required and sufficient for the formation of mitotic chromosomes *in vitro*. It remained unknown, however, which subunits of condensin I (and which sites of them) are phosphorylated and how phosphorylation of those individual sites regulates condensin I's functions. To address these questions, we expressed and purified a mutant holo-complex harboring alanine substitutions in ten of the potential CDK1 phosphorylation sites (10A mutant), and examined their ability to assemble chromosomes by adding them back into a *Xenopus* egg extract depleted of endogenous condensin complexes. Initially, we were surprised to find that the 10A mutant complex displayed a relatively mild defect in chromosome assembly. We noticed, however, that there were some technical concerns about the purified complexes used in the current assay. We will improve the constructs and purification conditions to resolve these problems and further examine the effects of additional phosphorylation site mutations to understand the detailed picture of phosphoregulation of condensin I during the process of mitotic chromosome assembly.

Functional analyses of recombinant condensin II complexes *in vitro* (Kozai)

Genomic DNA undergoes a series of morphological changes during the eukaryotic cell cycle, which culminate in the compaction of chromatin into a discrete set of rod-shaped chromosomes in mitosis. This process of chromosome condensation is essential for the faithful transmission of the genetic information into daughter cells. Among the key regulators in this process are large protein complexes, known as condensins. While the biological function and biochemical activity of condensin I (and its subunits) have been studied extensively, how condensin II works at a mechanistic level remains largely unexplored. During the past year, we have expressed and purified recombinant mammalian condensin II complexes, and succeeded in establishing an experimental assay for studying the function of recombinant condensin II in *Xenopus* egg extracts. We now plan to address the contribution of each regulatory subunit to the function of condensin II by using mutant complexes. Additionally, we will determine how condensin II cooperates with condensin I to assemble rod-shaped mitotic chromosomes.

Roles of condensin II in the organization of interphase chromatin (Ono)

Condensins I and II are multisubunit complexes that play essential yet distinct functions in mitotic chromosome assembly. Condensin II localizes to the nucleus during interphase, and initiates sister chromatid resolution even before the entry into mitosis. Previous studies from other laboratories reported that removal of condensin II causes swelling of nuclear chromatin and morphological abnormality of interphase nuclei in various cell lines including those of humans. These observations suggested that condensin II may contribute to the global organization of chromatin at cell cycle stages other than mitosis. It has remained unclear, however, whether the reported defects were caused directly by the loss of interphase-specific function(s) of condensin II, or indirectly by the chromosomal defects induced during the previous mitosis. During the past year, we have started to set up an experimental system in which a condensin II-specific subunit can be degraded acutely by an Auxin-inducible degron (AID) system (a collaboration with Imamoto's lab). Combination of the AID system and drug-induced cell synchronization enabled us to rapidly remove condensin II from the cell at specific stages of the cell cycle. We now plan to analyze how interphase-specific removal of condensin II affects nuclear morphology and global chromatin structure in detail.

Molecular analyses of a gene regulatory complex containing SMC-like domains (Kamada)

Eukaryotic genomic DNA forms a basal structure chromatin mediating histone molecules. Recruitment of transcription factors and machineries allows active gene expression from the platform structure. However, depending on the cell cycle stage, cells trigger to form heterochromatin for transcriptionally inactive chromosomal DNA regions. The conversion to the inactive chromatin is induced by methylation of cytosine bases on DNA region which the small digested RNA molecules can complementarily bind after the primary mRNA transcription. In recent years, many proteins coordinating between such RNAi factors and transcription

machineries were genetically identified as gene silencing factors. In a complex participating in RdDM (RNA-dependent DNA methylation) system in plants, one subunit contains a hinge domain commonly found in SMC proteins involved in eukaryotic chromosome condensation. Interestingly, a binding partner to this protein has also been discovered and contains an ATP energy-driving domain. However, the molecular functions and structural bases of these proteins remain unclear. We plan to clarify the network of interactions among the subunits participating in this system to understand the functional convergence and differences between proteins related to gene silencing and chromosome condensation.

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 Fellow

田根 将志 Shoji Tane
香西 誠 Makoto Kozai

Technical Staff

松浦 明子 Akiko Matsuura

Assistant

有光 いずみ Izumi Arimitsu

Part-timer

森山聖子 Seiko Moriyama