

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 (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. 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・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）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. コンデンシン複合体の分子構造生物学（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、それぞれの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ている。本年度は、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とScpB）を大腸菌内で発現させ精製した。ScpAは、N末端・中央・C末端の三つのドメイン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。これまでScpAとScpBとの結合比は1:1であると報告されてきたが、今回の詳細な解析から1:2であることがわかった。また、この結合比はヘッド・ドメインの存在下でも変わらなかった。現在、ATP存在下でのヘッド・ドメインの会合時における、SMCとnon-SMCサブユニット間の結合状態についての詳細な解析を進めている。

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が間期で細胞質に存在し、核膜崩壊後の染色体凝縮に参与するのに対して、コンデンシンIIは細胞周期を通じて核内に検出され、核膜崩壊以前から凝縮に貢献する。一方、分裂期染色体上では、コンデンシンIIはG-バンド領域（S期の遅い時期に複製される領域）に集中する傾向がみられた。これらの情報から、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。本年度は、蛍光免疫染色法とそのシグナルの定量的測定により、HeLa細胞のS期におけるコンデンシンIIの動態を詳細に解析した。その結果、S期の進行に伴ってコンデンシンIIの核内総量とクロマチンへの結合量が増加しており、コンデンシンIIが染色体凝縮以前のS期の段階ですでにクロマチンへの結合を開始していることが示唆された。今後、複製ストレス存在下におけるコンデンシンIIの動態を解析することにより、DNA複製と染色体凝縮がどのような関係にあるのかをさらに明らかにしていきたい。

3. コンデンシンの細胞周期制御 (木下、平野)

細胞周期におけるコンデンシンIとIIの細胞内動態と機能は、構成サブユニットの翻訳後修飾や相互作用する因子によって制御されていると予想される。しかし、その分子機構は未だ解明されていない。そこで我々は、分裂期および間期のカエル卵細胞抽出液から精製したコンデンシン複合体について質量分析法による比較解析をおこない、コンデンシンの細胞周期特異的な翻訳後修飾と相互作用因子の探索・同定を試みた。その結果、コンデンシンIとIIにおける分裂期特異的リン酸化部位を複数同定すると共に、新たな相互作用因子を見出すことができた。今後これらのリン酸化による修飾と新規相互作用因子がいかにしてコンデンシンIとIIの細胞周期特異的な機能発現と局在変化を制御しているのか、そのメカニズム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。ヒト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、これまでに、ヒト培養細胞抽出液を用いた免疫沈降実験から、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ている。本年度は、カエル卵抽出液を用いた解析を行った結果、MCPH1がコンデンシンIIの染色体結合において重要な役割を担っている証拠を得た。さらに、MCPH1の領域欠失変異体を利用した実験を行ったところ、このタンパク質におけるコンデンシンIIの染色体結合を制御する領域の同定に成功した。現在、MCPH1によるコンデンシンIIの制御機構をより詳細に解明すべく、この領域に注目した点変異体の解析を進めている。

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、1回のDNA複製後に2回の分裂が連続して起こる。とりわけ減数第一分裂では染色体は特有な挙動を示す。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。こうした減数分裂期におけるコンデンシンの役割についての知見は極めて限られている。本研究の目的は、マウスの生殖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。我々は、これまでに、コンデンシンIとIIが減数分裂過程で発現しており、それらの時空間的な動態が体細胞分裂のものとは異なることを見いだしている。本年度は、各種のコンデンシンサブユニットに対する抗体をマウス卵母細胞へ顕微注入することにより、コンデンシン機能の攪乱を試みた。その結果、コンデンシンIとIIは共に減数第一分裂における二価染色体の正常な形成に必要であることが示された。今後は、減数分裂における2つのコンデンシンの機能差やコヒーシンのとの関係に焦点をあて、解析を進める予定である。

6. 姉妹染色分体分割の分子メカニズム (新富、平野)

コヒーシンは姉妹染色分体を繋ぎ止めるタンパク質複合体である。動物細胞では、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、分裂後期に姉妹染色分体を同調的に娘細胞へ分配するために重要であると考えられている。我々は、カエル卵無細胞系を用いて、姉妹染色分体分割の分子メカニズムを検討した。コヒーシン結合タンパク質であるWaplあるいはPds5を除いた抽出液では、コヒーシンの染色体腕部からの解離と染色分体の分割が著しく阻害された。これらの異常は、それぞれヒトのWaplまたはPds5タンパク質を添加することで回復した。ヒトWaplの様々な断片や変異体を作製し、物理的相互作用や相補能を調べたところ、WaplはN末端の特徴的なアミノ酸モチーフ (FGFモチーフ) を介してPds5やコヒーシンと相互作用することにより分割を促進することが明らかになった。また、Sgo1と呼ばれる別のタンパク質は染色体腕部のコヒーシンの安定化をもたらすのに対し、分裂期キナーゼPlk1やaurora BはSgo1の機能を抑制することで分割を促進していることもわかった。これらの結果は、姉妹染色分体の分割過程が精緻な分子ネットワークによって制御されていることを示すものである。

Key Sentences:

1. To unlock the secret of chromosome architecture and segregation
2. To elucidate the molecular mechanisms of condensin 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 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 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 condensin and cohesin is tightly associated with several developmental diseases in humans. Our laboratory takes multidisciplinary approaches to understanding 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 (structural maintenance of chromosomes) 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 protein, we have used the *Bacillus subtilis* condensin complex as a model system and characterized their biochemical properties using the ATP-binding 'head' domain of the SMC subunit and some truncated forms of the two regulatory subunits. ScpA is composed of three regions, namely, the N-terminal, central and C-terminal regions. We find that the C-terminal region of ScpA directly binds to the head domain of SMC whereas the rest associates tightly with ScpB. Although a previous paper described that the stoichiometry of ScpA and ScpB was 1:1, detailed analyses show that it is 1:2 regardless the presence or absence of the SMC head domain. We plan to further explore various interaction modes between the SMC and non-SMC subunits and to understand how ATP-mediated dimerization of the SMC head domains might affect such interactions.

2. Condensins and chromosome architecture (Ono, Hirano)

Condensin I and II play essential yet distinct functions in the processes of mitotic chromosome assembly and segregation in vertebrate cells. 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 that are known to be replicated late in preceding S phase. This set of information allows us to propose the working hypothesis that condensin II may play a role in linking DNA replication to chromosome condensation. To test this hypothesis, we have examined the dynamics of condensin II during interphase in great details. Quantitative cell imaging analyses combined with immunostaining show that the total amount of nuclear condensin II and its detergent-resistant population increase in parallel with the progression of S phase, suggesting that condensin II may start to associate with chromatin during S phase long before chromosome condensation initiates. We are now extending these observations to get further insights into the functional relationship between DNA replication and chromosome condensation.

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

While two condensin complexes (condensin I and II) play crucial roles in chromosome condensation in mitosis, their spatial and temporal distributions are differentially regulated during

the cell cycle. It is anticipated that either post-translational modifications of condensin subunits or interactions with other factors might regulate mitosis-specific function and cell cycle-dependent localization of the complexes. As an attempt to understand cell cycle regulation of condensins, we have purified condensin fractions from M-phase and interphase *Xenopus* egg extracts and analyzed them by mass spectrometry. Comparative analysis allows us to identify multiple mitosis-specific modifications of condensin subunits and novel interacting proteins. We plan to further explore how those modifications and interacting factors regulate the cell cycle-dependent functions and behavior of the two condensin complexes.

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

Primary 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. Moreover, *in vitro* experiments using *Xenopus* egg extracts show that MCPH1 blocks chromosomal loading of condensin II in a highly specific fashion. Further experiments are now in progress to elucidate how MCPH1 might regulate condensin II at a mechanistic level.

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 by metaphase I. At anaphase I, homologous chromosomes, but not sister chromatids, separate from each other. It remains largely unknown 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. We found previously that both condensins I and II are expressed in meiosis, and that the loading pattern of each complex onto chromosomes is distinct from that in mitosis both spatially and temporarily. In the past year, we have attempted to disturb condensin functions by means of microinjection of specific antibodies into oocytes. Our results show that both condensins I and II are essential for the proper formation of bivalent chromosomes in meiosis I. We plan to explore further the functional difference between condensins I and II and the relationship between condensins and cohesins during meiosis.

6. Molecular dissection of sister chromatid resolution (Shintomi, Hirano)

The cohesin complex holds sister chromatids together until the cell splits into two. In most animal cells, bulk cohesin is released from chromosome arms in early mitosis, enabling sister chromatids to separate from each other rapidly and synchronously in late mitosis. To dissect this process, referred to as sister chromatid resolution, at a mechanistic level, we have used a cell-free system derived from *Xenopus* eggs. Depletion of Wapl (or Pds5) from egg extracts causes severe defects in sister chromatid resolution, which can be rescued by adding a recombinant human Wapl (or Pds5) protein back into the extracts. This experimental system together with extensive protein-protein interaction assays allows us to find that characteristic amino acid motifs (the FGF motifs) in Wapl coordinate its physical and functional interactions with Pds5 and cohesin subunits. Evidence is also obtained that Sgo1 plays a hitherto underappreciated role in stabilizing cohesion along chromosome arms, which is antagonized by the mitotic kinases Plk1 and aurora B. These results unveil an exquisite protein network that facilitates cohesin release from chromosome arms in early mitosis.

Principal Investigator

平野 達也 Tatsuya Hirano

Research Staff

小野 教夫 Takao Ono
鎌田 勝彦 Katsuhiko Kamada
木下 和久 Kazuhisa Kinoshita
李 智博 Jibak Lee
新富 圭史 Keishi Shintomi
山下 大輔 Daisuke Yamashita

Assistant and Part-timer

松浦 明美 Akemi Matsuura
小林 奈保美 Naomi Kobayashi
有光 いずみ Izumi Arimitsu