

## 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. 精製タンパク質を用いた染色体の再構成（新富、平野）

分裂期における染色体凝縮は正確な遺伝情報の継承に必須のプロセスである。近年の研究の進展にもかかわらず、染色体凝縮に必要なかつ十分な因子が確定された訳ではなく、どのようなメカニズムを通して凝縮が実現されるのかについても理解が乏しいままである。我々は、これらの問題を解決するためには、より洗練された新規の実験系の構築が不可欠であると考え、可能な限り少ない種類の精製タンパク質を用いて試験管内で染色体を再構成する試みに着手した。これまでの研究から、3種の主要な染色体構成タンパク質（コアヒストン、II型DNAトポイソメラーゼ、コンデンシンI）に注目し、これらをゲノムDNA上で正常に機能させることができれば、染色体再構成への大きな一歩になると考えた。これらの精製タンパク質標品を調製して様々な反応条件の検索を行った結果、上記3種のタンパク質因子のみから染色体様の構造を作り出すことに成功した。現在、実験系のさらなる改良を行い、各因子への変異導入を通して、それらの役割と協調作用を理解することを目指している。

#### 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生化学的解析（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、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複合体の発現・精製系の構築を試み、活性型の組換え複合体を再構成することに成功した。さらに特定のnon-SMCサブユニットを欠失させたサブ複合体、およびSMC二量体のATP結合モチーフに変異を導入したATPase変異型ホロ複合体の再構成にも成功している。精製タンパク質を用いた生化学的解析およびカエル卵抽出液における機能解析によると、欠失型と変異型の複合体はそれぞれに特有な機能欠損を示すことがわかった。今後、コンデンシン複合体の機能発現におけるATP結合・加水分解サイクルの役割と、それぞれのnon-SMC制御サブユニットの貢献について解析を進め、染色体構築におけるコンデンシンの分子機構の本質に迫りたい。

#### 3. バクテリア型コンデンシンの構造生物学・分子遺伝学的解析（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、SMC様タンパク質が存在し核様体の構築と分離

に参与している。バクテリア型のコンデンシンは、SMCホモ二量体と2種のnon-SMCサブユニット (ScpAとScpB) から構成される。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通して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 (*Bacillus subtilis*) のコンデンシン複合体をモデル系として解析を行っている。これまでに、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サブユニットの複合体を発現・精製し、生化学的解析によって、そのドメイン領域を同定した。今年度は、この結果をもとに、様々なnon-SMCサブユニット変異体を作製し、それらがSMCサブユニットのATP加水分解活性に与える影響を調べた。この結果、ScpBのC末端ドメインがScpA中央の可変領域への結合を介して、SMCサブユニットの加水分解活性を制御していることがわかった。我々がこれまでに解いた立体構造と併せて考えると、SMCサブユニットのヘッドドメインの会合はnon-SMCサブユニットの内部構造変化に応じて制御されていることが推測された。

#### 4. コンデンシンIIによるDNA複製と染色体構築の機能的な関係 (小野、平野)

多くの真核細胞では、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はよく似ているが、細胞周期の過程では互いに異なる制御を受けている。例えば、HeLa細胞を用いた解析によると、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、核膜崩壊以前の早い時期の凝縮に貢献する。我々はこれまでに、コンデンシンIIは分裂期に先立って、S期から染色体との結合を開始していることを見いだしていた。しかし、DNA複製そのものへの関与は認められず、S期におけるコンデンシンIIの役割は明確ではなかった。そこで本年度は、この役割を明らかにする目的で、特定のプローブを用いてFISH (fluorescence in-situ hybridization) を行うことにより、複製後の姉妹染色分体の挙動を解析した。この方法では、単一の染色体部位に検出されるシグナルは複製後にダブルドットとなることから、S期後期における姉妹染色分体間の距離を計測することができる。この解析の結果、コンデンシンIIを除去した細胞ではコントロール細胞と比較して、姉妹染色分体間の距離が短くなることが明らかになった。さらに、コンデンシンII除去細胞において複製を弱く攪乱すると、この距離はさらに短縮される傾向を示し、この条件下で分裂期に入った細胞では姉妹染色分体の凝縮と分離に重篤な異常が観察された。これらの結果から、コンデンシンIIによる姉妹染色分体の分割はS期から既に開始しており、この過程は分裂期における染色体構築の準備を担っていると考えられた。

#### 5. 小頭症の原因タンパク質MCPH1によるコンデンシンII複合体の制御 (山下、平野)

MCPH1は小頭症 (microcephaly) の原因タンパク質の一つであり、そのアミノ酸配列は脊椎動物間でも大きく変化している。こうした背景から、進化におけるMCPH1のアミノ酸置換が脳サイズの増大に貢献しているのではないかという興味深い可能性が指摘されている。我々はこれまでに、カエル卵抽出液を用いた無細胞系を確立することで、ヒトMCPH1がコンデンシンIIの負の制御因子として働くことを明らかにしてきた。本年度は、この無細胞系にマウスMCPH1あるいはカエルMCPH1を添加してみたところ、驚いたことに、それらの有するコンデンシンIIの阻害活性はヒトMCPH1に比べて極めて低いことが判明した。さらに、ヒトとマウス間での活性の違いを担うアミノ酸残基の同定を試みた結果、複数のアミノ酸残基の置換を組み合わせることにより、マウスMCPH1をヒトMCPH1様の高い活性を持つタンパク質に変換させることができた。これらの結果は、MCPH1によるコンデンシンIIの制御活性が進化の過程で変化していることを示唆するとともに、我々の開発した無細胞系がMCPH1の機能的進化を検出するための有力な手段となりうることを示している。

#### 6. 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)

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、染色体の構築に中心的な役割を果たす。最近になって、小頭症の原因タンパク質MCPH1がコンデンシンIIの機能を抑制する働きを持つことが示された。MCPH1を欠損した小頭症の患者では大脳皮質の矮小化が見られることから、コンデンシンIIの機能抑制が大脳皮質の正常な発生に重要であると予想された。ところが、大脳皮質の発生過程においてコンデンシンIとIIはいつどこで発現しているのか、そしてコンデンシンIIの制御異常がいかんして大脳の発生に影響を与えるのか、という問題の理解は進んでいない。そこで、我々はまず、胎生期のマウスの脳におけるコンデンシンIとIIの発現を調べた。コンデンシンの各サブユニットに対する抗体を用いた免疫染色を行ったところ、胎生中期から後期にかけて、コンデンシンIとIIは神経細胞を生み出す幹細胞である神経幹細胞に共に発現することが明らかとなった。今後は、条件的ノックアウトマウ

スを利用して神経幹細胞内のコンデンシン I あるいは II を除去することにより、それぞれのコンデンシンが脳皮質発生に果たす役割を明らかにする予定である。

#### 7. マウス卵母細胞の二価染色体形成における 2 つのコンデンシンの役割 (李、平野)

減数分裂は、配偶子形成に必須な過程であり、その染色体の形成・分離の様式は体細胞分裂の様式と大きく異なる。例えば、減数第一分裂中期においては一對の相同染色体がペアとなって二価染色体を形成し、それらは第一分裂後期に分離する。我々は、マウス卵母細胞の体外培養系を利用して、2 つのコンデンシンがこの特徴的な染色体動態にどのように関与するかを調べた。免疫蛍光染色法により、コンデンシン I と II は、それぞれ固有の動態を示すことがわかった。とりわけ、減数第一分裂中期の二価染色体上では、コンデンシン I は主にセントロメア周辺にだけ局在するのに対し、コンデンシン II は染色分体の中心軸に沿って局在する。そこで、様々なコンデンシンサブユニット (I と II に共通、I 特異的、II 特異的) に対する抗体を卵母細胞に顕微注入することにより、機能攪乱実験を試みた。その結果、2 つのコンデンシン複合体は、共に哺乳類の減数分裂において正常な染色体の構築に必要なことがわかった。また、両者は固有の働きをもち、コンデンシン I は姉妹キネトコア配向に、コンデンシン II は染色体の軸形成に中心的な役割を担うことが推測された。

#### 8. 単細胞紅藻をモデル系としたコンデンシン I と II の解析 (藤原、平野)

多くの真核細胞では、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。しかし、2 つのコンデンシンの間にはどのような機能の差異があるのか、また、それぞれの機能がいかんして染色体の構築に寄与しているのか、という本質的な問題についての理解はいまだに乏しい。この問題を進化的視点から理解する目的で、我々は単細胞性の紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (以下シズンと略す) に着目した。シズンは、ゲノムサイズが小さく、遺伝子数も少ないにも関わらず 2 つのコンデンシンを有する。そのため、シズンはコンデンシンの基本的な制御機構を解明するために有力な生物であると考えられた。本年度は、免疫染色法と ChIP-qPCR 法を組み合わせることで、細胞周期における 2 つのコンデンシンの局在を詳細に解析した。その結果、染色体上における両者の時空間的な局在の差異を明確に示すことが出来た。驚くべきことに、シズンで観察された 2 つのコンデンシンの特徴的な動態は、これまでに動物細胞で報告されてきた動態と酷似していた。すなわち、こうした時空間制御は進化的に保存された重要な特性であると考えられた。

## 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 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 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 mitotic chromosomes from purified components (Shintomi, Hirano)

Chromosome condensation is essential for accurate transmission of genomic information during mitosis. Despite recent progress, what makes mitotic chromosomes and how they are assembled remain poorly understood. To unlock these questions, we have sought to reconstitute chromosomes from as few purified components as possible in a test tube. We focused on three major components of mitotic chromosomes, namely, core histones, topoisomerase II and condensin I, and attempted to set up a protocol in which they were properly assembled on genomic DNA in an ordered fashion. Extensive surveys allowed us to find a highly promising condition in which 'chromosome-like' structures could be assembled starting from these three components. We now plan to refine the current protocol further and to start dissecting cooperative actions of these components during the process of chromosome assembly.

#### 2. Reconstitution and biochemical analysis 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 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 have developed an experimental system for expressing and reconstituting condensins I and II from recombinant subunits, and succeeded in purifying functionally active complexes with high purity and high yields. We also prepared a panel of sub-complexes lacking one or more of the regulatory subunits and a set of holo-complexes harboring point mutations in their SMC ATPase domains. We now plan to investigate the role of the SMC ATPase cycle and the functional contribution of each non-SMC subunit to condensin functions. These efforts will help elucidate how the mechanochemical action of condensins promotes dynamic conformational changes of chromosomes during mitosis.

### **3. Structural and genetic analyses of the bacterial condensin complex (Kamada, Hirano)**

It is remarkable to find that SMC or its related proteins exist in many eubacterial species and that they in fact participate in nucleoid organization and segregation. In *Bacillus subtilis*, the “condensin” complex is composed of an SMC homodimer and two auxiliary non-SMC subunits, known as ScpA and ScpB. We are using this simple form of condensin as a model system to understand their structural basis of action. We had previously reconstituted a recombinant subcomplex composed of ATP-hydrolysis-responsible domain (head domain) of the SMC subunit and the non-SMC subunits. During the past year, we have measured ATPase activities of the SMC subunit in the presence of various truncated forms of ScpA and ScpB. It was found that the C-terminal domain of ScpB contributes to the regulation of SMC ATPase through its binding to the middle domain of ScpA. Together with structural information, we suggest that internal structural changes of the non-SMC subunits modulate head-head engagement of the SMC dimer.

### **4. Functional link between DNA replication and chromosome assembly mediated by condensin II. (Ono, Hirano)**

Most eukaryotic cells possess two different condensin complexes, known as condensins I and II. The two complexes play essential yet distinct functions in the processes of mitotic chromosome assembly and segregation. In HeLa cells, for example, 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. We had found previously that condensin II starts to associate with chromosomes during S phase, although its depletion has little impact on S phase progression. It remained poorly understood, however, what function(s) condensin II might have within the nucleus before mitotic entry. During the past year, we have employed fluorescence in-situ hybridization (FISH) analyses to visualize specific duplicated chromosomal loci in late S phase. The distance between sister FISH signals decreased in condensin II-depleted cells compared to control cells, suggesting that condensin II-mediated resolution of sister chromatids initiates as early as in late S phase. Application of mild replicative stress to condensin II-depleted cells exacerbated their defective phenotypes, leading to poor resolution of sister chromatids in metaphase and gross segregation defects in anaphase. We propose that condensin II is a critical factor that links chromosome duplication to assembly.

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

Mutations in human MCPH1 cause primary microcephaly, which is characterized by marked reduction in brain size. MCPH1 is a fast-evolving protein, raising the intriguing possibility that changes in its amino-acid sequences might contribute to brain size expansion during evolution. We had shown previously that human MCPH1 functions as a negative regulator of condensin II in *Xenopus* egg cell-free extracts. During the last year, we used this cell-free assay to test the activities of MCPH1 from different vertebrate species. To our surprise, we found that mouse and *Xenopus* MCPH1 display much weaker activities than human MCPH1. We also identified a combination of specific amino-acid substitutions that is sufficient to convert mouse MCPH1 into the one with human-like activity. These results suggest that the activity of MCPH1 to regulate condensin II might have changed during evolution, and that the cell-free assay developed here offers a powerful method for dissecting the functional evolution of MCPH1.

### **6. Functional analysis of condensins I and II in the developing cerebral cortex (Nishide, Hirano)**

Condensins I and II play a central role in a chromosome assembly during mitosis in most eukaryotes. It has been reported that condensin II activity is negatively regulated by MCPH1, a protein whose mutations cause primary microcephaly in humans. Patients with microcephaly display marked reduction of their cerebral cortices, raising the possibility that condensin II may need to be down-regulated during development of the cerebral cortex. Very little is known, however, about how condensins I and II might be expressed in the developing cerebral cortex, or whether misregulation of condensin II might indeed contribute to abnormal brain development. To examine potential roles of condensins I and II in brain development, we have examined expression of their subunits in the developing cerebral cortex in mice, where neurons are generated from neural stem cells (NSCs). Immunofluorescence analysis using specific antibodies revealed that subunits of

condensins I and II are both expressed in NSCs at mid and late embryonic stages. We now plan to explore the physiological roles of condensins in NSCs by using conditional knockout mice.

#### **7. Roles of condensins I and II in the assembly of bivalent chromosomes in mouse oocytes (Lee, Hirano)**

Meiosis is a special type of cell divisions to produce gametes and is different from mitosis in its mode of chromosome assembly and segregation. In meiosis I, for instance, homologous chromosomes are connected with their partners to make a bivalent chromosome and separate from each other in anaphase I. We have investigated, by using an *in vitro* culture system of mouse oocytes, how condensins I and II might participate in this unique behavior of meiotic chromosomes. Immunofluorescence analysis revealed that condensins I and II display distinct behaviors throughout meiosis. Especially, on a bivalent chromosome at metaphase I, condensin I was localized mainly around centromeres, whereas condensin II were distributed along chromatid axes. To disturb condensin functions, mouse oocytes were injected with various kinds of antibodies against subunits (common to both condensins, or unique to condensin I or II). The results demonstrated that both condensins I and II are essential for the proper assembly of bivalent chromosomes, yet in distinctive fashions. We propose that condensin I might contribute to monopolar attachments of sister kinetochores in a bivalent chromosome whereas condensin II might play a major role in the formation of chromatid axes.

#### **8. Cell cycle regulation of condensins I and II in a unicellular red alga (Fujiwara, Hirano)**

Condensins I and II play a central role in chromosome assembly and segregation in vertebrate cells. It remains poorly understood, however, whether the two complexes might have distinct functions and how such functions might contribute to progressive conformational changes of chromosomes during mitosis. To address these questions from an evolutionary point of view, we are using the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* as a model organism. While the genome of *C. merolae* is very small, being comparable with that of budding yeast, it encodes all subunits of both condensins I and II (note that budding yeast has only condensin D). During the past year, we have used a combination of immunofluorescence and chromatin immunoprecipitation-qPCR (ChIP-qPCR) analyses, and demonstrated that the spatiotemporal localizations of condensins I and II on mitotic chromosomes were clearly different from each other. The differential behaviors of the two condensin complexes observed in *C. merolae* were strikingly similar to those reported in human cells, implicating the existence of an evolutionarily conserved mechanism of condensin regulation.

***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***

李 智博      Jibak Lee  
山下 大輔      Daisuke Yamashita  
西出 賢次      Kenji Nishide  
藤原 崇之      Takayuki Fujiwara

***Technical Staff***

松浦 明子      Akiko Matsuura

***Assistant***

有光 いずみ      Izumi Arimitsu

***Part-timer***

樽谷 愛理      Airi Tarutani  
小林 奈保美      Naomi Kobayashi