

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。

神経幹細胞におけるコンデンシン I と II の遺伝学的解析 (西出、平野)

大脳皮質の発生過程において、神経幹細胞は対称分裂による自己複製と非対称分裂による神経産生を行う。いずれの場合でも、染色体をふたつの娘細胞に均等に分配することが必要不可欠であるが、神経幹細胞における染色体分離の研究は極めて限られている。この問題を明らかにする一助として、条件的ノックアウトマウスを利用して神経幹細胞におけるコンデンシン I と II の除去を試みた。これまでに、神経幹細胞からコンデンシン I と II を同時に除去すると分裂期染色体の構築と分離に大きな異常が生じること、コンデンシン I のみを除去すると分裂期の進行が遅れること、コンデンシン II のみの除去により染色体の分離に異常が生じることを明らかにしてきた。本年度は、コンデンシン II を除去した神経幹細胞の間期核内において、セントロメア近傍のヘテロクロマチンと核小体がそれぞれ過度にクラスター化した構造が生じることを新たに見出した。間期核内構造のクラスター化は（コンデンシン II が発現していない）神経細胞においても観察されたことから、幹細胞の段階で確立された核内構造異常は神経細胞にも引き継がれることが示唆された。これらの結果は、ふたつのコンデンシンの機能分担の進化という問題にも大きな光を与えるものである。

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M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 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と組み合わせることにより、特定のサブユニットの機能解析が可能となった。さらにタグ標識型組換えサブユニットを用いて各種複合体のふるまいを追跡出来る新規アッセイ系を確立した。これらの実験系を駆使することにより、HEATリピートを有する2つのnon-SMCサブユニットが拮抗的に機能しながら染色体の軸構造の形成に寄与していることが明らかとなった。今後、HEATリピートの生化学的・生物物理学的性質とその変化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。

研究年報

精製タンパク質を用いた分裂期染色体の再構成 (新富、平野)

分裂期における染色体構築は細胞増殖に必須のプロセスである。しかし、どのようにしてヌクレオソーム繊維が染色体へと折り畳まれるのかという疑問には、未だ明確な答えは得られていない。この本質的問題を解くための第一歩として、私たちは試験管内で分裂期染色体を再構成できる画期的な実験系を確立した。この新規再構成系では、カエルの精子由来のクロマチンと 6 種類の精製タンパク質因子 (コアヒストン、ヌクレオプラスミン、Nap1、FACT、トポII、リン酸化型コンデンシン I) を ATP 存在下で混和することによって染色体構築のプロセスを再現することができる。再構成系を駆使した一連の解析から、ヒストンシャペロン FACT が初期胚型ヒストンバリエント H2A.X-F を含むヌクレオソームを不安定化し、トポIIやコンデンシン I による大規模なクロマチン構造変化を促進する可能性が示唆された。さらに、Cdk1 によるコンデンシン I のリン酸化が染色体構築に必要かつ十分な翻訳後修飾であることも明らかにした。今後は、個々の因子の機能を明らかにするとともに、物理的および化学的見地から染色体構築プロセスを理解することも視野に入れ、再構成系の改良を進めたい。

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)

コンデンシンは分裂期染色体の構築に必須なタンパク質複合体である。カエル卵抽出液から精製したコンデンシン 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することが知られており、染色体構築の本質的な反応のひとつと考えられている。しかしこれまでの機能解析は主に naked DNA を基質としたものであり、コンデンシンがいかにして生体内の基質であるクロマチンに作用するかという問題についての理解は進んでいない。我々はこの問題を解決するために、生体内を反映し、かつ操作の容易なクロマチン基質を使った実験系を確立しようと考えた。分裂期のカエル卵抽出液と精子核をインキュベートすると、単一染色分体からなる染色体が形成される。一方でカエル卵抽出液と裸の環状 DNA を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。本年度は、このミニ染色体の構築と精製法を確立した。その結果、ミニ染色体のタンパク質組成は精子核由来染色体のそれとよく一致していることがわかった。この実験系を用いると、ミニ染色体のサイズや基質 DNA の配列がコンデンシンの機能に与える影響など、これまでになく精密な解析が可能になるものと期待される。

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)

多くのバクテリアにおいても、真核生物のコンデンシンによく似た複合体が存在し、それらは核様体の構築と分離に関与している。バクテリア型のコンデンシンは、ホモ二量体を形成する SMC サブユニットと二種の制御サブユニット (ScpA と ScpB) から構成される。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核様体へリクルートされることが知られているが、その分子機構は明らかではない。SMC サブユニットは ATP 加水分解反応を担う領域 (ヘッドドメイン) を有し、制御サブユニットがこの加水分解反応を制御している。電子顕微鏡観察によると、制御サブユニットは、SMC 二量体の V 字状末端に存在する 2 つのヘッドドメインのうち一方のみに結合していた。ところが、制御サブユニットにある変異を導入すると、この V 字構造が大きく変化することがわかった。すなわち、制御サブユニットの構造的変化は SMC ヘッドドメインの会合に大きな影響を与えるらしい。現在、この変異を有する制御サブユニットを細胞内に発現し、SMC 複合体の動態への影響を調査している。

コンデンシンが作る染色体軸様構造の解析 (小野、平野)

細胞が分裂期に入ると、クロマチン繊維が折りたたまれて高度に凝縮した染色体が形成される。コンデンシン I と II は凝縮を完了した姉妹染色分体の「芯」となる縦軸に集中して局在するが、この特徴的なコンデンシンの局在が染色体凝縮にどのように関与しているのかは分かっていない。興味深いことに、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 (scaffold と呼ばれる) は残存することが知られている。我々は、コンデンシンが作る軸様構造がいかにして染色体の形成と維持に関与しているのかという問題を理解するために、この軸様構造を人工的に操作する実験系の確立を試みている。まず、塩濃度に依存して染色体形態と軸様構造を可逆的に変化させることのできる条件を見出した。興味深いことに、コンデンシンを除去した染色体においてはこの可逆的变化が大きく損なわれていた。今後は、この実験系を進展させることにより、いまだに謎の多い分裂期染色体の分子的特性を理解していきたい。

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.

Genetic analyses of condensins I and II in neural stem cell divisions (Nishide, Hirano)

During development of the cerebral cortex, neural stem cells (NSCs) divide symmetrically to proliferate and asymmetrically to generate neurons. Although faithful segregation of mitotic chromosomes is critical for NSC divisions, its fundamental mechanism is not fully understood. We have investigated the roles of condensins I and II in NSCs using conditional knockout mice, in which each or both of condensins can be depleted. We find that simultaneous depletion of both condensins leads to severe defects in chromosome assembly and segregation. Interestingly, chromosome missegregation is observed more prominently in NSCs depleted of condensin II, whereas mitotic delays are detectable only in condensin I-depleted NSCs. Further analysis shows that NSCs depleted of condensin II display hyperclustering of pericentric heterochromatin and nucleoli, and such defects in interphase nuclear architecture are taken over to postmitotic neurons. Our results demonstrate that condensins I and II have overlapping and non-overlapping functions in NSCs, and also shed light on the evolutionary aspect of "division-of-labor" of two condensin complexes widely conserved among eukaryotes.

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 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 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. We also established a novel assay using a pair of differentially tagged, recombinant complexes, which allowed us to follow different behaviors of the wild-type and mutant versions of condensin I during the process of chromosome assembly. Our results show that

balancing acts of two non-SMC subunits containing HEAT repeats support dynamic assembly of chromosome axes. We now plan to address the molecular basis of chromosome axis formation by further exploring biochemical and biophysical features of the HEAT subunits.

Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors (Shintomi, Hirano)

Proper assembly of chromatids during mitosis is essential for cell proliferation. It is largely unknown, however, about how a nucleosome fiber is folded into a large-scale chromatid structure. To solve this fundamental question, we have established an *in vitro* system in which mitotic chromatids can be reconstituted by mixing frog sperm chromatin with only six purified factors: core histones, three histone chaperones (nucleoplasmin, Nap1, and FACT), topoisomerase II (topo II), and a mitotically phosphorylated form of condensin I. This reconstitution system enables us to find that the embryonic histone variant H2A.X-F and FACT predispose nucleosome arrays to ATP-dependent actions of topo II and condensin I. We also demonstrate that phosphorylation of condensin I directly catalyzed by Cdk1 is the sole post-translational modification necessary and sufficient for chromatids reconstitution. This experimental system will be instrumental in dissecting the mechanisms of action of individual factors and their cooperation, and in understanding the folding process of mitotic chromatids from physical and chemical points of view.

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 was shown that purified condensin I has the ability to introduce positive superhelical tension into double-stranded DNA in an ATP-hydrolysis-dependent manner, it remains unknown how this activity might act on nucleosome fibers. To approach this problem, we reasoned that it would be a good idea to use minichromosomes, small chromatin-like structures assembled on closed circular double-stranded DNA, as a template for condensins. During the past year, we successfully established an experimental protocol for assembling and purifying minichromosomes assembled in frog egg extracts. Our analyses demonstrated that the minichromosomes share many biochemical properties with sperm chromatin-derived chromatids assembled in frog egg extracts. We anticipate that this experimental system 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)

Most prokaryotes have a condensin-like complex that plays an essential role in the organization and segregation of the nucleoid. The prokaryotic condensin complex, which is composed of an SMC homodimer and two auxiliary proteins (ScpA and ScpB), is recruited to origin-proximal chromosomal region of replication. The SMC dimer has two ATP-binding head domain. ScpAB regulates ATP hydrolysis by SMC and controls overall action of the whole complex. As judged by electron microscopic analysis, the full complex displays an asymmetric configuration in which the ScpAB subcomplex is bound to only one end of the V-shaped SMC homodimer. During the past year, we found that introduction of certain mutations into ScpAB changed the overall architecture of the full complex, indicating that internal structural changes of ScpAB affect engagement of the SMC head domains. We now plan to express the corresponding mutant forms of ScpAB in bacterial cells, and to test their effects on the localization and dynamics of the SMC complex.

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

When cells enter mitosis, chromatin fibers are folded, eventually being converted into highly condensed, metaphase chromosomes. Both condensins I and II are concentrated along the central axial region of each chromatid within the condensed chromosomes. Interestingly, it had been shown decades ago that histone-depleted chromosomes prepared under high-salt conditions retain axial structures known as the chromosome scaffold. The scaffold fraction was later found to contain condensin subunits. To understand how condensin-based chromosome axes might contribute to the assembly and structural maintenance of chromosomes, we sought to establish a set of experimental protocols for manipulating the morphology and property of chromosome axes *in situ*. In preliminary experiments, we find that the overall morphology of chromosomes and condensin-based axes can reversibly be changed under different salt conditions. Interestingly, the reversible changes were heavily distorted in cells depleted of condensins. We anticipate that extension of this experimental system will allow us to shed new light on the still-mysterious, physicochemical properties of mitotic

chromosomes.

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

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