

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：特別推進研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20002010

研究課題名（和文） コンデンシンによる染色体構築の分子メカニズム

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of chromosome assembly mediated by condensins

研究代表者

平野 達也（HIRANO TATSUYA）

独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・主任研究員

研究者番号：50212171

研究成果の概要（和文）：

染色体の構築と分離は、遺伝情報の継承と発現のために必須な過程である。本研究課題では、この過程に中心的な役割をもつ分子群、コンデンシン（およびコヒーシン）と呼ばれるタンパク質複合体に焦点をあて、染色体ダイナミクスの総合的理解を目指した。多彩な実験材料と多角的なアプローチを組み合わせ、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ことにより、大きな成果を得た。さらに、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（特に小頭症）についても理解を深めることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The assembly and segregation of chromosomes represent two of the fundamental processes that ensure faithful inheritance and expression of the genetic information. In the current study, we have investigated the structure, function and regulation of condensins (and cohesins) that play central roles in these processes. A wide variety of experimental systems (frog egg extracts, tissue culture cells, mouse oocytes, and red-algal and bacterial cells) and interdisciplinary approaches (cell biology, molecular genetics, biochemistry, and structural biology) were effectively combined, leading to an integrated picture of how this highly sophisticated class of molecular machines might work *in vivo* and *in vitro*. The outcome of the current study also expanded and deepened our evolutionary insights into chromosome architecture and the etiology of a human disease accompanying condensin's misregulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	78,600,000	23,580,000	102,180,000
2009年度	75,500,000	22,650,000	98,150,000
2010年度	78,900,000	23,670,000	102,570,000
2011年度	76,100,000	22,830,000	98,930,000
2012年度	46,900,000	14,070,000	60,970,000
総計	356,000,000	106,800,000	462,800,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：染色体・コンデンシン・細胞周期・有糸分裂・減数分裂

1. 研究開始当初の背景

多くの真核生物は、2つの異なるコンデンシン複合体（コンデンシン I と II）を有することが知られていたが、両者に特異的な機能があるのか、どのように差次的に制御されているのか、という問題についての理解は遅れていた。一方、これらの巨大なタンパク質複合体がどのような分子メカニズムを通して染色体構築に関与しているのか、という問題については、構造と機能の両面において決定的に情報が不足していた。

2. 研究の目的

- (1) コンデンシン（とコヒーシン）の細胞内機能とその制御を理解する。
- (2) コンデンシン（とコヒーシン）の生体内機能を理解する。
- (3) コンデンシンの分子メカニズムを理解する。

3. 研究の方法

- (1) カエル卵抽出液と培養細胞を用い、特に3つの課題（コンデンシンとコヒーシンのバランスによる染色体形態の制御、小頭症の責任タンパク質 Mcph1 によるコンデンシン II の制御、コンデンシン II による DNA 複製と染色体凝縮の連係）に焦点をおいて研究を進めた。
- (2) マウスの各種組織（精原細胞・卵母細胞・神経幹細胞等）におけるコンデンシンとコヒーシンの発現と機能を理解する目的で、特異的抗体を用いた組織染色および条件的ノックアウトマウスの作製を行った。さらに、2つのコンデンシンを有する最も単純な生物として原始紅藻シズン新たなモデル生物として導入し、細胞生物学・遺伝学的解析を行った。
- (3) 枯草菌のコンデンシンをモデルとして、生化学・タンパク質結晶解析・電子顕微鏡観察を組み合わせ、その分子メカニズムを探った。また、組換えサブユニットから真核細胞のコンデンシン複合体（およびその変異体）を完全再構成し、カエル卵抽出液を組み合わせた機能検定を行った。

4. 研究成果

(1.1) カエル卵抽出液を用いて、コンデンシン I と II の存在比を精密に操作できる実験系を確立し、これらの複合体がどのように協調して染色体の形状を決定するかについて詳細な解析を進めた。その結果、2つのコンデンシン（とコヒーシン）の精妙なバランスが中期染色体の形態を決定していることを証明することができた (Shintomi and Hirano, G&D, 2011)。

(1.2) カエル卵抽出液を用いた解析を通して、小頭症の原因タンパク質 Mcph1 のアミノ末端ドメインがコンデンシン II の負の制御因子として働いていることを明らかにした。さらに、Mcph1 の中央ドメインが（アミノ末端ドメインと協同して）染色体形態の制御に関わっていることを示すと同時に、このタンパク質の機能的進化についての興味深い知見を手にいれた (Yamashita et al, JCB, 2011)。

(1.3) コンデンシンIIが分裂期に先だってS期のうちから染色体に結合を開始することを見いだした。間期核クロマチンを強制的に分裂期染色体様の構造に変換する手法

(premature chromosome condensation [PCC]) を改良し、複製前後における染色体形態の変化を可視化することを試みた。複製後期のPCC誘導細胞では、コンデンシンIIは複製を終えた領域のみに見いだされ、2本の染色分体の軸上に局在していた。一方、コンデンシンIIを除去した細胞においてPCCを誘導すると、複製後期に観察される姉妹染色体の分割が大きく抑制された。次に、fluorescence in-situ hybridization (FISH) 解析を行い、コンデンシンIIが複製したDNAをS期のうちに分離させていることを確認した。これらの結果から、コンデンシンIIは既にS期から姉妹染色分体の分割を開始して分裂期染色体の凝縮と分離の準備を進めていると結論した (Ono et al, JCB, 2013)。

(1.4) カエル卵抽出液を用いた解析を通して、2つのタンパク質 (Wapl と Pds5) がコヒーシンと直接相互作用することによりコヒーシンのクロマチンからの解離と染色分体分割に必須の役割を果たすことを示した。また、これらの因子が2つの分裂期キナーゼ (Plk1 と CPC) とは異なるメカニズムによ

て分割過程に貢献していること、Sgo1 がこの過程に対して拮抗的に働いていることを明らかにした (Shintomi and Hirano, G&D, 2009)。

(2.1) マウス卵母細胞をモデル系として減数分裂期における2つのコンデンシン複合体の染色体局在を解析した結果、体細胞分裂に共通する特性に加えて減数分裂に特有の動態が観察された。特に、第一減数分裂中期において、コンデンシン I が染色体腕部に存在せず、セントロメア付近に集中していることは興味深かった。コンデンシンに対する抗体を卵母細胞に顕微注入すると、第一減数分裂中期の遅延、染色体形態の異常および姉妹キネトコアの配向の乱れが引き起こされた。以上の結果から、コンデンシンは2価染色体の構築と分離に必須の役割をもっていることが明らかとなった (Lee et al, MBoC, 2011)。

(2.2) コンデンシン I と II に共通のサブユニットとそれぞれに特異的なサブユニットを条件的にノックアウトできるマウスを製作することに成功した。これらのマウスを用いて、大脳皮質発生における2つのコンデンシンの協同的役割と差次的役割を明らかにするとともに、減数分裂における両者の役割の解析を進めている。

(2.3) マウスの減数分裂期に特異的に発現する新規コヒーシン・サブユニット RAD21L を発見し、このタンパク質が相同染色体の対合に重要な役割を果たしていることを示唆するデータを得た (Lee and Hirano, JCB, 2011)。

(2.4) 2つのコンデンシンを有する最も単純な生物・原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (通称シゾン) を新たなモデル系としてコンデンシンの動態と機能を解析した。その結果、進化的に大きな隔たりをもつにも関わらず、シゾンのコンデンシンは哺乳類細胞の複合体と極めて良く似た動態を示すことがわかった。また、驚くべきことに、この生物ではコンデンシン II の遺伝子を破壊しても生育可能であった。これらの知見は、染色体構築と動態の進化について大きな示唆を与えるものである (Fujiwara et al, under revision)。

(3.1) 枯草菌由来のコンデンシンの制御サブユニット (ScpAB) の結晶構造を決定するとともに、そのダイナミックな構造変換がSMC ATPaseとカップルしていることを見いだした。さらにホロ複合体 (SMC-ScpAB) を精製して電子顕微鏡観察によりこの複合体分子を可視化した結果、ScpAとScpBの制御サブユニットはSMCヘッドドメインの一方にしか結合しておらず、SMC-ScpA-ScpBの量比が2:1:2であることがわかった。この非対称な構造は、SMCのATP加水分解能を欠失させた各種の変異体でも観察されることから、SMC複合体のもっとも基礎的な構造であると考えられた (Kamada et al, Structure, 2013)。

(3.2) バキュロウイルス発現系を用いてコンデンシンの組換えサブユニットを発現させ、2つのコンデンシン複合体 (I と II) の完全再構成に成功した。さらに特定の non-SMC 制御サブユニットを欠失させたサブ複合体、および SMC コアサブユニットの ATP 結合モチーフに変異を導入した変異型ホロ複合体を用いた解析から、コンデンシン複合体の機能発現における各 non-SMC ブユニットの貢献と ATP 結合・加水分解サイクルの役割が明らかになりつつある。

(4) コンデンシンに関する包括的総説 (Hirano, G&D, 2012) を発表、またミニレビューを多数 (Hirano, Mol. Cell, 2009 他) 執筆することにより分野のリーダーとしての役割を果たした。

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

*日本語総説 2 報 (1,11) 以外はすべて査読有。

1. 西出賢次, 平野達也 (2013) 真核生物は2つのコンデンシンをどのように使い分けているのか? 細胞工学 32 : 304-308.
2. Ono, T., D. Yamashita, and T. Hirano. (2013). Condensin II initiates sister chromatid resolution during S phase. *J. Cell Biol.* 200:429-441 (selected as an issue highlight; featured as the cover image).
3. Kamada, K., M. Miyata and T. Hirano.

- (2013). Molecular basis of SMC ATPase activation: role of internal structural changes of the regulatory subcomplex ScpAB. *Structure*. 21:581-594.
4. Hirano, T. (2012). Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions. *Genes Dev*. 26:1659-1678.
 5. Hirano, T. (2012). Chromosome territories meet a condensin. *PLOS Genet*. 8(8): e1002939. doi:10.1371/journal.pgen.1002939.
 6. Shiheido, H., Y. Naito, H. Kimura, H. Genma, H. Takashima, T. Ono, T. Hirano, W. Du, T. Yamada, N. Doi, S. Iijima, Y. Hattori and H. Yanagawa. (2012). An anilinoquinazoline derivative inhibits tumor growth through interaction with hCAP-G2, a subunit of condensin II. *PLOS ONE*. 7(9):e44889. doi:10.1371/journal.pone.0044889.
 7. Lee, J., and T. Hirano. (2011). RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J. Cell Biol*. 192:263-276.
 8. Shintomi, K. and T. Hirano. (2011). The relative ratio of condensin I to II determines chromosome shapes. *Genes Dev*. 25:1464-1469 (featured as the cover image).
 9. Lee, J., S. Ogushi, M. Saitou, and T. Hirano. (2011). Condensins I and II are essential for construction of bivalent chromosomes in mouse oocytes. *Mol. Biol. Cell*. 22:3465-3477 (featured as the cover image).
 10. Yamashita, D., K. Shintomi, T. Ono, I. Gavvovidis, D. Schindler, H. Neitzel, M. Trimborn, and T. Hirano. (2011). MCPH1 regulates chromosome condensation and shaping as a composite modulator of condensin II. *J. Cell Biol*. 194:841-854 (selected as an issue highlight).
 11. 木下和久, 平野達也 (2011) SMC ATPase: コンデンシンとコヒーシンのコアサブユニット. *生体の科学* 62 : 446-449.
 12. Shintomi, K. and T. Hirano. (2010). Sister chromatid resolution: a cohesin releasing network and beyond. *Chromosoma*. 119:459-467.
 13. Hirano, T. (2010). How to separate entangled sisters: interplay between condensin and decatenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:18749-18750.
 14. Gavvovidis, I., C. Pöhlmann, J. A. Marchal, M. Stumm, D. Yamashita, T. Hirano, D. Schindler, H. Neitzel and M. Trimborn. (2010). MCPH1 patient cells exhibit delayed release from DNA damage-induced G2/M checkpoint arrest. *Cell Cycle* 9:4893-4899.
 15. Hirano, T. (2009). Let's play polo in the field of condensation. *Mol. Cell*, 34:399-401.
 16. Shintomi, K. and T. Hirano. (2009). Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev*. 23:2224-2236 (featured as the cover image).
 17. Takemoto, A., K. Maeshima, T. Ikehara, K. Yamaguchi, A. Murayama, S. Imamura, N. Imamoto, S. Yokoyama, T. Hirano, Y. Watanabe, F. Hanaoka, J. Yanagisawa, and K. Kimura. (2009). The chromosomal association of condensin II is regulated by a non-catalytic action of PP2A. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 16:1302-1308.
- [学会発表] (計 17 件 : すべて研究代表者による発表)
1. GRC 2013 Chromosome Dynamics (招待講演) "Functional dissection of condensin I by using recombinant subunits", Lucca, Italy, 2013.05.26-05.31.
 2. The 8th 3R Symposium (招待講演) "Role of condensin II in reorganizing chromosomes during S phase", Awaji, Japan, 2012.11.25-11.28.
 3. The 106th International Titisee Conference (招待講演) "Can we reconstitute a mitotic chromosome from purified components?", Titisee, Germany, 2012.10.10-10.14.
 4. BSCB/BSDB/JSBC Joint Spring Meeting (招待講演) "Condensins and evolutionary insights into chromosome condensation", Warwick, UK, 2012.04.15-04.18.

5. 第34回日本分子生物学会（ワークショップ・オーガナイザー）”Universality and diversity of condensin regulation”, 横浜、日本、2011.12.13-12.16.
6. Topo 2011（招待講演）”A tale of two condensins: differential regulation and concerted actions”, Taipei, Republic of China, 2011.10.12-10.16.
7. MEXT International Symposium（招待講演）”A tale of two condensins: differential regulation and concerted actions”, Hakone, Japan, 2011.06.29-07.01.
8. 日本生化学会関東支部例会（招待講演）「2つのコンデンシン：その特異性と協調性」東京、日本、2011.06.25.
9. 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会（ワークショップ・オーガナイザー）”Concerted actions and differential regulation of two condensin complexes”, 神戸、日本、2010-12.07-12.10.
10. The 7th 3R Symposium（招待講演）”A tale of two condensins: differential regulation and concerted actions”, Toyama, Japan, 2010.10.26-10.30.
11. The 57th NIBB Conference（招待講演）”A tale of two condensins: differential regulation and concerted actions”, Okazaki, Japan, 2010.10.14-10.16.
12. 第60回染色体学会（特別講演）「染色体構築の分子基盤：コンデンシンとコヒーシンからみた新しい染色体像」、松江、日本、2009.11.12-11.14.
13. Switzerland-Japan Joint Meeting（招待講演）”Molecular mechanisms of sister chromosome resolution”, Villars sur Ollon, Switzerland, 2009.05.14-05.16.
14. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会（招待講演）”Regulation of condensin I and II during mitosis and meiosis”, 神戸、日本、2008-12.09-12.12.
15. 広島大学大学院先端物質科学研究科創立10周年記念講演会（招待講演）「染色体構築の謎を探る：カエル卵からヒト遺伝疾患まで」、広島、日本、2008.11.06.
16. The 4th GCOE Symposium on Chromosome Biology（招待講演）”Regulation of

- condensin I and II during mitosis and meiosis”, Tokyo, Japan, 2008.10.24-10.25.
17. LRI Symposium on Chromosome Biology（招待講演）”How do condensins get loaded onto chromosomes during the cell cycle?”, London, UK, 2008.05.28-05.30.

〔その他〕

研究室 HP

<http://www.riken.jp/chromdyna/>

http://www.riken.jp/chromdyna/index_en.html

RIKEN RESEARCH (Research Highlights: Secrets of Separation)

<http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/research/6088>

RIKEN RESEARCH (Frontlines: Unlocking the chromosome)

<http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/frontline/6485>

RIKEN RESEARCH (Research Highlights: Shaping up for cell division)

<http://www.rikenresearch.riken.jp/eng/research/6727>

理研ニュース#346（研究最前線：生命の根本を担う染色体を解明する）

理研チャンネル-TouTube（高校理科から最先端研究へ）

<http://www.youtube.com/watch?v=ZzMfbFYJwv0>

<http://www.youtube.com/watch?v=W1RM6IbptPc>

<http://www.youtube.com/watch?v=itaLkqQ6nDs>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 達也 (HIRANO TATSUYA)

独立行政法人理化学研究所・平野染色体ダイナミクス研究室・主任研究員

研究者番号：5 0 2 1 2 1 7 1