

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251003

研究課題名(和文) コンデンシン複合体の生体内機能

研究課題名(英文) In vivo functions of the condensin complexes

研究代表者

平野 達也 (Hirano, Tatsuya)

国立研究開発法人理化学研究所・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：コンデンシンIとIIがいかにして分裂期染色体構築に関わるかを理解する目的で、細胞内の染色体を可逆的に脱組織化・再組織化する新しいアッセイ系を確立するとともに、機械学習プログラムを利用した画像解析を導入した。その結果、この再組織化反応にはコンデンシンIIが大きく貢献しており、コンデンシンIの貢献は小さいことがわかった。また、胎生中期のマウス神経幹細胞からコンデンシンI、コンデンシンIIおよびその両者に共通するサブユニットをノックアウトする実験系を確立し、細胞増殖と染色体分離における欠損表現型の詳細を調べたところ、両者は細胞増殖において重複した機能および独自の機能を有することが判明した。

研究成果の概要(英文)：To understand how condensins I and II contribute to mitotic chromosome assembly, we have developed a set of two-step protocols for inducing reversible assembly of mitotic chromosome structures in situ, which is combined with quantitative morphological analyses using a machine-learning algorithm. It was found that condensin II has a more crucial role in the reorganization process than condensin I, shedding new lights on the physico-chemical properties of mitotic chromosomes supported by condensins. We have also investigated the roles of condensins I and II in neural stem cells (NSCs) using conditional knockout mice, in which each or both of condensins could be depleted. Our results demonstrated that condensins I and II have both overlapping and non-overlapping functions in NSCs, providing additional evidence for "division-of-labor" of the two condensin complexes at a tissue level.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞・組織 タンパク質 遺伝学 ゲノム 分化・発生

1. 研究開始当初の背景

コンデンシンは、分裂期染色体の構築と分離において中心的な役割を果たす巨大なタンパク質複合体である。研究代表者・平野は、1997年に最初の複合体(コンデンシン I)を世界にさきがけて発見し、さらに2003年には第2の複合体(コンデンシン II)を報告した。これら2つの複合体はSMCコアサブユニットを共有するが、異なるセットのnon-SMC制御サブユニットをもつ。初期の研究から、両者は細胞周期で異なる制御を受けており、また染色体構築において異なる貢献をすることが示唆されていたが、その機能分担の詳細については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞レベルおよび組織レベルでコンデンシン I と II の機能分担を理解することにあった。

3. 研究の方法

(1) 細胞レベルにおけるコンデンシンの機能分担：当初はコンデンシン II の間期核内における機能、特に染色体脆弱部位 (common fragile sites) の顕在化に対する影響を解析することを計画していたが、それを評価するための技術的困難に直面した。そこで、分裂期染色体構築における2つのコンデンシンの差別的貢献という問題に立ち返り、細胞内の染色体を可逆的に脱組織化・再組織化する新しいアッセイ系を確立した。このアッセイ系では、Mgキレート剤を含む低張バッファで分裂期細胞を処理すると染色体はおおきく膨潤する(脱組織化)が、これを適切な塩濃度のバッファにさらすと染色体は可逆的にもとの形態に戻す(再組織化)ことができる。siRNA (small interfering RNA) を用いてそれぞれのコンデンシンを除去した細胞に対してこの操作を適用し、染色体の形態変化を定量的に見積もるために機械学習プログラムを利用した画像解析を行った。

(2) 組織レベルにおけるコンデンシンの機能分担：胎生中期のマウス神経幹細胞から特異的にコンデンシン I、コンデンシン II およびその両者に共通するサブユニットをロックアウトする実験系を確立し、細胞増殖と染色体分離における欠損表現型の詳細を調べた。また、K. Nasmyth (Oxford) との共同研究により、マウス卵母細胞からそれぞれのコンデンシンをロックアウトする実験系を構築した。

4. 研究成果

(1) 細胞レベルにおけるコンデンシンの機能分担：コンデンシン I と II がいかにして分裂期染色体構築に関わるかを理解する目的で、細胞内の染色体を可逆的に脱組織化・再組織化する新しいアッセイ系を確立し、機械学習プログラムを利用した画像解析を行った。その結果、この再組織化反応にはコンデンシン II が大きく貢献しており、コンデンシン I あるいはトポイソメラーゼ II の貢献は小さいことがわかった。この結果は、コンデンシンのサブユニット(特にHEATサブユニット)が有する特徴的な物理化学的性質が、どのように分裂期染色体の構築に貢献しているかという問題に対して大きな示唆を与えるものである。

(2) 組織レベルにおけるコンデンシンの機能分担：胎生中期のマウス神経幹細胞において、コンデンシン I、コンデンシン II およびその両者をロックアウトする実験系を用いた結果、2つのコンデンシンは細胞増殖と染色体分離において重複した機能と独自の機能を有することを明確に示すことができた。分裂期における染色体構築異常と分離異常はそれぞれのコンデンシンのロックアウトに特有の表現型が観察された。また、両者をロックアウトした細胞ではより重篤な欠損が見られた。また、コンデンシン II のロックアウトは間期核においてクロモソームの過集合という極めて特徴的な表現型を引き起こ

すことがわかった。卵母細胞を用いた実験からは、減数第一分裂期から受精後の第一卵割まではコンデンシン II の機能がドミナントであることを明らかとなった。コンデンシン I とコンデンシン II 両者のノックアウトでは、もはや染色体と認識される構造は見出されなかった。この観察は、体細胞だけでなく減数分裂細胞においても、コンデンシンが染色体構築に中心的な役割を果たしていることを証明したばかりでなく、これまでの除去・ノックダウン実験で観察されていた「マイルドな」表現型は不完全な除去に起因することを強く示唆した。すなわち、長年研究者を悩ましていた“コンデンシン・パラドックス”の解消に大きな役割を果たした実験であるということが出来る。さらに、コンデンシンが有する、スピンドルチェックポイントの不活化における減数分裂特有の役割についても理解を深めることができた。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者に下線)
〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Takagi, M., T. Ono, T. Natsume, C. Sakamoto, M. Nakao, N. Saitoh, M. T. Kanemaki, T. Hirano, N. Imamoto. (2018). Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms. *J. Cell Sci.* 131:jcs212092. 査読有
2. Ono, T., C. Sakamoto, M. Nakao, N. Saitoh, and T. Hirano. (2017). Condensin II plays an essential role in reversible assembly of mitotic chromosomes in situ. *Mol. Biol. Cell.* 28:2875-2886. 査読有
3. Houliard, M., J. Godwin, J. Metson, J. Lee, T. Hirano, and K. Nasmyth. (2015). Condensin confers the longitudinal rigidity of chromosomes. *Nat. Cell Biol.* 17:771-781. 査読有

4. Nishide, K., and T. Hirano. (2014). Overlapping and non-overlapping functions of condensins I and II in neural stem cell divisions. *PLoS Genet.* 10:e1004847. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ono T., C. Sakamoto, M. Nakao, N. Saitoh, T. Hirano. "Condensin II plays an essential role in reversible assembly of mitotic chromosomes in situ" The 2nd meeting on SMC proteins - chromosomal organizer from bacteria to human - (2017)
2. Ono T, C. Sakamoto, M. Nakao, N. Saitoh, T. Hirano. "Physicochemical properties of condensin-based chromosome axes as revealed by an in-situ reorganization assay" 日本分子生物学会 第 39 回年会 (2016)
3. 小野教夫、坂本智代美、中尾光善、斉藤典子、平野達也「再組織化アッセイをもちいた染色体軸の物理化学的特性の解析」染色体学会 第 67 回年会 (2016)
4. Ono, T., T. Hirano. "Diverse functions of condensin II through the cell cycle" The 5th Asian Chromosome Colloquium (Bangkok, Thailand, 2015)
5. 小野教夫、平野達也「コンデンシンがつくる染色体軸の特性:可逆的再組織化アッセイを用いた解析」第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会合同研究会 (2015)
6. 西出賢次、平野達也「神経幹細胞分裂におけるコンデンシン I と II の役

割」日本分子生物学会 第 37 回年会
(2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

平野達也 (HIRANO, Tatsuya)

国立研究開発法人理化学研究所・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