

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15032

研究課題名(和文)減数分裂期の染色体軸形成を担うコヒーシンとHORMAD1の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural study of cohesin and HORMAD1 in meiotic chromosome axis formation

研究代表者

菊池 壮太郎(Kikuchi, Sotaro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90866386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトHORMAD1の立体構造をX線結晶構造解析を用いて明らかにするとともに、コヒーシンとの相互作用を生化学的、細胞生物学的に解析し、HORMAD1の減数分裂における構造基盤を得ることを目的とした。大腸菌発現系を用いて高純度なヒトHORMAD1の調製を行い、X線解析に十分な収量を得ることに成功したが、構造解析に用いられる結晶は得られなかった。精製過程においてHORMAD1が複数のコンフォメーションを有することが示唆され、結晶化に影響を与えていることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの遺伝情報を担うDNAは、細胞分裂時に染色体として高度に折り畳まれ娘細胞へと均等に分配されている。染色体の均等分配に関わるタンパク質複合体コヒーシンは、複製や修復など様々な機能に関与しており、その異常は遺伝性疾患や不妊、がんなどを引き起こすことが知られている。本研究対象であるHORMAD1は減数分裂型の制御に関わっており、本研究から示唆されたHORMAD1の複数のコンフォメーション変化が、減数分裂特有の制御メカニズムに深く関わっていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the steric structure of Human HORMAD1 using X-ray crystallography and to analyze its interaction with cohesin biochemically and cell biologically to obtain the structural basis of HORMAD1 in meiosis. We succeeded in preparing highly purified human HORMAD1 using an E. coli expression system and obtained sufficient yield for X-ray analysis, but did not obtain crystals for structural analysis. It was suggested that HORMAD1 had multiple conformations during the purification process, which may have affected crystallization.

研究分野：構造生物化学

キーワード：構造生物化学

1. 研究開始当初の背景

私たちのカラダは約 37 兆個の細胞から構成されており、その細胞一つ一つに遺伝情報を担うゲノム DNA が収納されている。全長約 2m のゲノム DNA が細胞核内に高度に折りたたまれて存在しており、これらは細胞分裂の際、染色体を形成し 2 つの娘細胞へと均等に分配される。ヒトを含む高等真核生物においては、体細胞分裂と減数分裂と呼ばれる二つの細胞分裂様式が知られており、体細胞分裂では 1 つの体細胞が同じ遺伝情報をもつ二つの娘細胞へと分裂するのに対し、減数分裂では父母由来の相同染色体同士での対合と組換えを伴う(図 1)。体細胞分裂が絶えず行われることで私たちのカラダは形成・維持されており、減数分裂によって次世代に自らの遺伝子を多様化させ、継承させていくことができる。この染色体の分配に異常が起こると、Down 症候群や Klinefelter 症候群などの染色体異常疾患、骨髄性白血病や不妊症、がん等の様々な疾患を引き起こすことが知られる。染色体がどのように次代へと正確に受け継がれていくのか、そしてその異常がどのようなメカニズムで疾患を引き起こすかという問いは多くの研究者によって研究が紡がれてきたが、まだまだ不明な点が多く残っている。

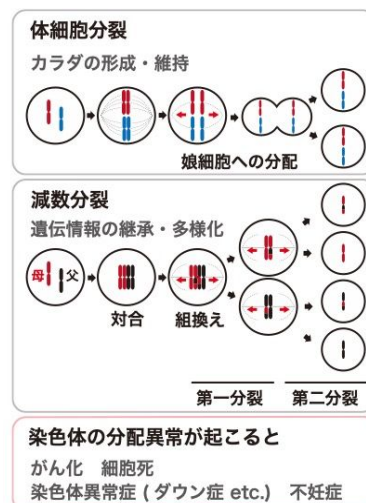


図 1. 体細胞分裂と減数分裂における染色体分配

コヒーシンは姉妹染色分体の接着をはじめとし、転写制御や DNA 修復など、染色体に関する様々な機能に参与するリング状のタンパク質複合体で、その異常はがんやコヒーシン病と呼ばれる遺伝性疾患を引き起こすことが知られている。近年の構造解析技術の発展により、コヒーシンの構造生物学的研究も大きく進展しており、結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡によりサブユニットの多くが明らかになっているが、減数分裂型コヒーシンの構造はまだ報告されていない。

HORMAD1 は減数分裂において、染色体の軸構造(シナプトネマ複合体)の形成に関わるタンパク質であり、DNA の二重鎖切断酵素 Spo11 を染色体にリクルートすることで組換えを制御している。HORMAD1 欠損マウスでは染色体不対合がみられ、トリプルネガティブ乳がん(TNBCs)では HORMAD1 の発現量の増加が報告されている。近年、減数分裂において染色体軸形成を制御するタンパク質 HORMAD1 が減数分裂コヒーシンと REC8、SMC3 を介して相互作用することが報告された。この相互作用は第一減数分裂期の染色体軸の形成に関わっていると考えられる。

そこで、申請者は減数分裂を司るコヒーシンと HORMAD1 に着目し、構造機能解析によって減数分裂の構造基盤を得ることを目指し、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では減数分裂に着目し、染色分配制御に参与するコヒーシンサブユニットである REC8 と SMC3、軸形成の制御に参与する HORMAD1 に着目し、構造生物学的研究によりその分子基盤を明らかにし、染色分配の制御メカニズムを明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

REC8 は減数分裂特有のコヒーシンサブユニットであり、体細胞型コヒーシンのサブユニットである RAD21 のホモログにあたる。SMC3-RAD21 については高純度な試料調製に成功しており、SMC3-REC8 複合体についてはコドン最適化された合成遺伝子を導入したコンストラクトを作製し、精製条件の検討を行った。

HORMAD1 は二次構造予測と HORMAD1 のホモログである HORMA ファミリータンパクタンパク質の構造を基に、様々な長さのコンストラクトを大腸菌発現系にサブクローニングし、精製条件の検討と結晶化スクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) コヒーシンサブユニット SMC3-REC8 複合体の試料調製

RAD21 のアミノ酸配列を基にコドン最適化された REC8 の N 末端領域のコンストラクトを作製し、単体での発現を、また SMC3 との共発現を大腸菌発現系を用いてそれぞれ検討したが、REC8 の十分なタンパク質の発現を確認することができなかった。

(2) HORMAD1 の試料調製と結晶化スクリーニング

HORMAD1 は二次構造予測を基に N 末端または C 末端の領域を削ったコンストラクトを用いて結晶構造解析に用いる試料調製の検討を行った。高純度な試料が得られたコンストラクト(図 2)について、それぞれ結晶化スクリーニングキットを用いて 384 条件で結晶が得られるかの検討を行ったが X 線実験に用いられるクオリティの結晶を得ることはできなかった。精製段階においてゲル濾過カラムクロマトグラフィーで HORMAD1 由来の複数のピークが見られ、それぞれの計算分子量が HORMAD 単体のものとオリゴマー化しているものと考えら得るピークであった。これらを分離しそれぞれ結晶化スクリーニングを行ったが結晶は得られなかった。分離したものを再度ゲル濾過カラムに供したところ、再び複数のピークが観察されたため、HORMAD1 は複数のコンフォーメーション変化を起こしていることが考えられた。

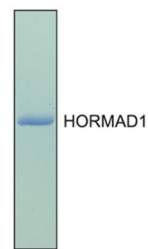


図2 HORMAD1精製標品

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nanaura Hitoki, Kawamukai Honoka, Fujiwara Ayano et al	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25560-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shiota Tomo, Nagata Riko, Kikuchi Sotaro, Nanaura Hitoki, Matsubayashi Masaya, Nakanishi Mari, Kobashigawa Shinko, Isozumi Noriyoshi, Kiriyama Takao, Nagayama Kazuaki, Sugie Kazuma, Yamashiro Yoshito, Mori Eiichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 C9orf72-Derived Proline:Arginine Poly-Dipeptides Modulate Cytoskeleton and Mechanical Stress Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 750829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.750829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------