

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440039

研究課題名(和文) DNAメチル化導入を制御する蛋白質複合体と染色体凝縮因子との構造的関連性

研究課題名(英文) Structural studies of a common domain between a regulatory complex involved in DNA methylation and SMC complexes for chromosome maintenance

研究代表者

鎌田 勝彦 (KAMADA, Katsuhiko)

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・専任研究員

研究者番号：70360526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：染色体凝縮に関わる蛋白質の構成ドメインをもち、エピジェネティックな発現抑制に関与している特異的な蛋白質複合体存在する。これら二つの機構にまたがる蛋白質の共通ドメインの構造的関連性について調査した。バクテリアのヒンジドメインの非対称な二量体構造を明らかにすることによって、それがSMC複合体の全体構造の変化に寄与する一端を説明することができた。加えて、ヒンジドメイン様のサブユニットを含む植物特異的な複合体の最小安定領域を決定することができた。

研究成果の概要(英文)：In recent years, many protein complexes involved in epigenetic gene control were genetically identified. Interestingly, a plant-specific protein complex participating in the regulation contains a hinge-like domain commonly found in proteins, which are involved in eukaryotic chromosome condensation. I investigated the structural relationship of the domain found over these two systems. The crystal structure of the hinge domain of the bacterial SMC protein reveals an asymmetric dimer with a half-opened interface, clarifying involvement of the domain for conformational changes of the overall structure within the SMC complex. I also identified minimal components of the plant-specific complex essential for the stable association to aim further structural analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：蛋白質複合体 染色体凝縮 X線結晶構造解析 エピジェネティック

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物のゲノム DNA は、ヒストン分子を伴い、クロマチンと呼ばれる構造を形成している。活性型クロマチンは、転写因子を介して活発な遺伝子発現を誘導する。一方、不活性型であるヘテロクロマチンは、エピジェネティックなゲノム情報の維持において重要であるが、解明されている分子レベルの詳細はほんの一部に過ぎない。

(2) ヒストンの修飾に加えて、DNA のメチル化も重要なエピジェネティックマークとして知られている。特に、植物では、相同 RNA 鎖を介して導入されたシトシンのメチル化が下流の転写を不活性化させる RdDM (RNA-dependent DNA methylation) 機構の存在が知られている。最近の遺伝学的研究の結果から、RdDM を誘導する一群の蛋白質因子が同定され、加えて、それらと植物特異的な RNA ポリメラーゼ V を結びつける複合体 (DDR complex) の存在が解ってきた。この複合体は、RNA ポリメラーゼ V によって転写された RNA と、メチル基が導入される鋳型 DNA 領域を担保する、いわばクランプ様分子と推察されているが、その詳細は不明なままである。

(3) 近年、私は、SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) 蛋白質やその制御因子の構造機能解析に取り組んできた。SMC 蛋白質は、二量体化を担うヒンジドメインを有しており、このドメインと制御因子によって形成される巨大なリング構造が、高次の染色体の形成や維持に関わっていることが知られている。

(4) 興味深いことに、RdDM 機構の一端を担う DDR 複合体には、既知の SMC 蛋白質群に見られるヒンジドメインを持つサブユニットと ATP エネルギー駆動型サブユニットを備えている。このことは、SMC 複合体に見られる分子構成とダイナミックな分子制御が RdDM 機構にも存在することを示唆している。

2. 研究の目的

遺伝子不活性化機構と染色体形成機構に関与する蛋白質のドメインに注目し、立体構造解析によって機能的な関連性を調査し、蛋白質ドメインの普遍性を考察する。

3. 研究の方法

(1) 比較対象となる染色体形成機構に関わる SMC 蛋白質のヒンジドメインの領域を選定し、組換え蛋白質として発現し、立体構造解析をおこなう。

(2) DDR 複合体のサブユニットの相互作用ネットワークを組換え蛋白質を用いて確認する。抽出された最小領域が安定な複合体をとり得るかどうかが検証する。

4. 研究成果

(1) バクテリア SMC 蛋白質のヒンジドメインの立体構造解析

SMC 蛋白質は真核生物のコンデンシンによく似た複合体であり、バクテリアでも広く保存され、核様体の維持を担っている。以前の研究において、中等度好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* 由来の SMC 蛋白質を利用して経緯があり、そのヒンジドメインを含む遺伝子領域をクローニングした。隣接するコイルドコイル領域の長さを変えた様々なコンストラクトを作製し、大腸菌でそれらの蛋白質を発現した。精製した組換え蛋白質のいくつかは、polyethylene glycol を沈殿剤とする様々な条件下で結晶が得られた。その結晶を用いて、SPring-8 の理化学研究所のビームラインで回折データを収集し、モデルの精密化を行った。最終的に 2.2 分解能で、このヒンジドメインの立体構造を決定した。

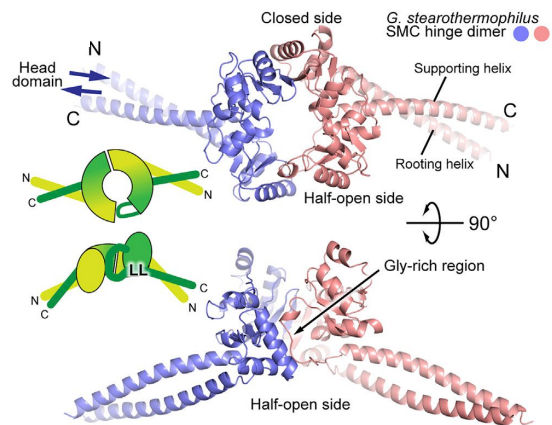


図1 非対称構造を持つ SMC ヒンジドメインの二量体構造のリボンモデル 挿入されている緑と黄色のグラデーションの模式図はドメインの N 末端と C 末端の方向を表している。

得られたヒンジドメインの構造は、これまで報告されている 2 回対称のものとは異なり、非対称の 2 量体構造を取っていた。この理由は、リング状のヒンジドメイン二量体にある二つの相互作用面の一方が半開きになった状態であることに由来する (図 1)。加えて、コイルドコイルの付け根にある疎水性アミノ酸 (LL) がヒンジドメイン側に結合し、コイルドコイル領域を反対方向へ向かわせているためである (図 2)。疎水性アミノ酸が露出した緊縮型のヒンジドメインの構造との比較から、今回決定した構造は、弛緩型の構造であると考えられ、SMC 複合体の全体構造の変化に寄与する一端を説明することができた。

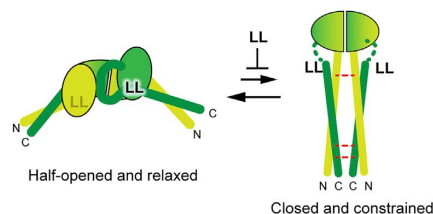


図2 考えられる SMC ヒンジドメインの構造変化

リング状のヒンジ二量体の中心は塩基性アミノ酸が集中しており、バクテリアから高等真核生物の SMC 蛋白質において共通している。ドメインの精製蛋白質を用いて、1 本鎖 DNA 及び RNA への結合能を蛍光偏向解消法によって調査したところ、ヒンジ二量体は、どちらの 1 本鎖核酸に対しても、 $\mu\text{M}$  レベルの結合活性を示した。ヒンジドメインは、この弛緩型の非対称構造を介して核酸と結合していると推察された。

## (2) 組換え蛋白質を用いた DDR 複合体の再構成

DDR 複合体は植物特異的な RNA ポリメラーゼ V の転写に同行し、メチル化される DNA 基盤を確保していると考えられ、現在までに DMS1 (DRD1), DMS3, DMS7(RDM1), DMS11 の 4 つの遺伝子産物が複合体の候補サブユニットとしてリストされている。DMS3 は SMC 蛋白質に見られるヒンジドメインを有している。しかしながら、現状では、この複合体を構成する蛋白質のどこからどこまでが、安定な複合体形成に必要な領域であるのか明らかになっていない。

そこで、これら 4 つの遺伝子産物の複合体の形成能を指標に、安定なサブコンプレックスを単離調製することを初期目標とした。まず、シロイヌナズナの cDNA ライブラリーから候補遺伝子のクローニングを行った。それらの産物を大腸菌で発現させると DMS7 は可溶性画分に見られたが、その他の蛋白質は不溶性画分に留まった。DMS3 は、ヒンジドメインのそばに同様のコイルドコイル領域を持つと考えられるため、それら以外の余分なアミノ酸の欠失させたところ、ある程度の可溶性を示したが、培養条件によってはその性質が安定しない問題が残った。

そのため、DMS3 は大腸菌に最適化されたコドン持つ遺伝子を人工合成することに加え、DMS7 との共発現を試したところ、DMS3 可溶性が改善され、複合体としてゲル濾過によって精製することができた。その構成量論比は 4:4 のオリゴマーであることが判明した。

この組換え DMS3-7 複合体を、各種プロテアーゼによる限定分解し、MALDI-TOF 質量分析やアミノ酸配列解析によって、安定な領域を含むドメインの両アミノ酸末端を分析することができた。その後、DMS3 のコイルドコイル領域の状態を推測し、さらにいくつか長さの異なるコンストラクトを作製した。これらの組換え蛋白質を用いて DMS7 との結合状態を確認したところ、DMS7 は DMS3 のヒンジドメインと結合するが、ある長さより短いコイルドコイル領域をもつ DMS3 とは結合しなくなることがわかった。この結果から、DMS7 の結合は、DMS3 の傍にあるコイルドコイル領域のコンフォメーションに依存していると推察することができた。この結果は、SMC 蛋白質複合体に含まれるヒンジドメインにも同様のコンフォメーション変化があること

がことと類似している。これらの精製した複合体を様々な沈殿剤を使って結晶化を試みたが、解析に十分は結晶を得ることはできなかった。

DMS3-7 二量体の安定な複合体をバキュロウイルス・昆虫細胞で発現し、さらに DMS1 または DMS11 を同時に発現することができる系を再構築した。DMS11 は他のどのサブユニットとも結合を確認することができなかった。この結果から、これまで文献上で確認されている DMS11 蛋白質の関与は、DDR の安定な複合体形成に寄与するものではないと推察された。一方で DMS1 は DMS3-7 二量体に安定に結合することが解った。しかも、その結合領域は DMS1 のヘリケースドメインから独立した非常に短い部分に限定された(図 3)。結論として、DDR 複合体の構造的なコアとなる領域は、これら三つのサブユニットが担っていると考えられた。

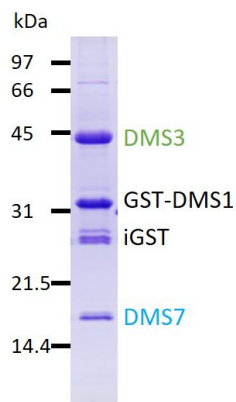


図 3 昆虫細胞で発現し、GST カラムによって精製された DMS1-3-7 複合体の最小単位。iGST は SF9 細胞由来の GST 蛋白質

今後、精製した三者複合体を、MALDI-TOF 質量分析や各種プロテアーゼによる限定分解のステップを駆使し、各蛋白質の構造的に安定な領域までさらに絞り込み、核酸への結合の可能性を検証していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Katsuhiko Kamada and Daniela Barilla. Bioessays. 2018 Feb;40(2). (査読有)  
Combing Chromosomal DNA Mediated by the SMC Complex: Structure and Mechanisms.  
doi: 10.1002/bies.201700166.

Katsuhiko Kamada, Masayuki Su'etsugu, Hiraku Takada, Makoto Miyata and Tatsuya Hirano. Structure. 2017 Apr 4;25(4):603-616.e4. (査読有)Overall Shapes of the SMC-ScpAB Complex Are

Determined by Balance between Constraint and Relaxation of Its Structural Parts.  
doi: 10.1016/j.str.2017.02.008.

〔学会発表〕(計10件)

Katsuhiko Kamada(代表) Transition of Overall Structure of the Bacterial SMC Complex、The second international meeting on SMC proteins Chromosomal organaizers from bacteria to human、2017年6月14日、南陽市文化会館(山形県・南陽市)

Katsuhiko Kamada(代表) Transition of Overall Structure of the Bacterial SMC Complex、Chromosome Dynamics・Gordon Research Conference、2017年5月22日、Barga (Italy)

鎌田勝彦(代表) バクテリア SMC 複合体のリング開閉機構、第11回日本ゲノム微生物学会年会、2017年3月4日、慶応大学(神奈川県・藤沢市)

鎌田勝彦(代表) バクテリア SMC 複合体のリング開閉機構、第89回日本生化学会大会、2016年9月25日、東北大学(宮城県・仙台市)

鎌田勝彦(代表) バクテリア SMC 複合体のリング開閉機構、2016年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2016年8月29日、KKR ホテル熱海(静岡県・熱海市)

鎌田勝彦、バクテリアの核様体の維持蛋白質 SMC 複合体、招待講演、2016年6月10日、九州大学薬学部(福岡県・福岡市)

鎌田勝彦(代表) バクテリア SMC 複合体のダイナミクス、第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

鎌田勝彦、バクテリアの核様体の維持蛋白質 SMC 複合体、招待講演、2016年6月6日、九州大学農学部(福岡県・福岡市)

鎌田勝彦(代表) SMC 蛋白質複合体の変異体解析、2015年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、2015年8月27日、雄山荘(滋賀県・大津市)

鎌田勝彦(代表) SMC 蛋白質複合体の変異体解析、第9回日本ゲノム微生物学会年会、2015年3月7日、神戸大学(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.riken.jp/chromdyna/jp/members/kamadak.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 勝彦 (KAMADA, Katsuhiko)

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・専任研究員

研究者番号：70360526

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし