

平成22年3月15日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570117

研究課題名（和文） 染色体凝縮因子コンデンシンの構造生物学

研究課題名（英文） Structural biology of proteins related on chromosome condensation

研究代表者

鎌田 勝彦（KAMADA KATSUHIKO）

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・専任研究員

研究者番号：70360526

研究成果の概要：

枯草菌のコンデンシンの SMC と non-SMC サブユニットの組換え蛋白質を用いて、機能領域を同定しそれらの生化学的性質を調査した。この結果、①バクテリアの non-SMC サブユニット ScpA は、シャペロンである ScpB の結合によって、その分子内構造変化が誘導されていること、②その際に ScpA 内のドメイン間領域が、コンデンシン複合体の形成と解離の制御に重要な役割を示していることを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：蛋白質複合体

1. 研究開始当初の背景

染色体は遺伝情報の担い手として古くから顕微鏡下で観察されてきたが、分裂期における、動的な構造変換の分子基盤についての理解は大変遅れていた。その理由としては、細胞から純粋な染色体を単離することが技術的に非常に困難であったこと、また構成タンパク質の機能を解析するアッセイがなかったことなどが挙げられる。しかし、これらの問題を回避するための有力なアプローチとして、近年アフリカツメガエル卵抽出液を利用した染色体の試験管内再構成系が開発

され、新規のタンパク質複合体コンデンシンが染色体の凝縮とその構造維持に必要であることを見いだされた。

コンデンシン複合体のコアとなるサブユニットは、SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) と総称され、約 50nm の長さのヘリックスコイル領域のアームと ATP 加水分解のファミリーに属するドメインを持つ (図 1)。SMC サブユニットは、さらに non-SMC 制御サブユニットと結合し、コンデンシンのホロコンプレックスを構成する。また、高等真核細胞には異なるセットの non-SMC サブユニ

ットをもつ第2の複合体（コンデンシン II）が存在することがわかっている（図1）。

一方原核細胞は、核膜をもたず、染色体 DNA は細胞内で核様体と呼ばれる高次構造を形成している。真核細胞の染色体が規則的な核内領域を占有しているように、バクテリアの核様体も 10kb ほどの単位で折り畳まれ、ある一定の配向性をもって細胞内に存在している。実際核様体の構築には、コンデンシンの原型ともいえる SMC 蛋白質と2種類の制御サブユニット（ScpA、ScpB）が関与していることが明らかになっている。原核細胞における核様体の構築や配置には、真核細胞における染色体のそれらと共通する分子基盤があると考えられる（図1）。

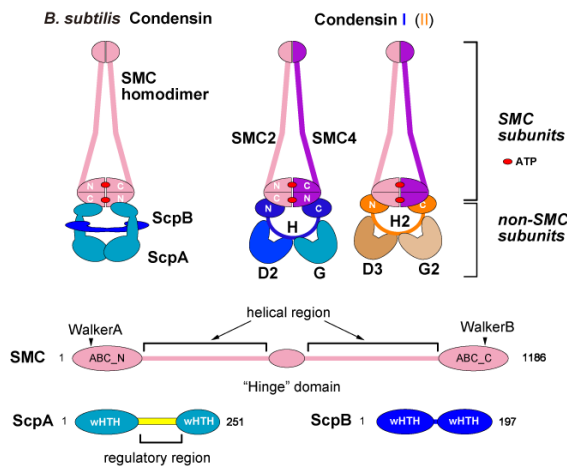


図1 バクテリア(古草菌)と真核生物のコンデンシンサブユニット構成の比較

2. 研究の目的

SMC サブユニットの部分構造については、古細菌等のホモログを中心とした解析からある程度の理解が進んでいるが、non-SMC サブユニットの分子機構はほとんどわかっていない。本申請者は、non-SMC サブユニット分子がどのような構造的基盤を介して SMC サブユニットの活性を制御しているか、という問題を理解すべく研究を進めていく。特に、枯草菌等のバクテリアコンデンシンの組換え蛋白質を用いて、機能領域を同定しその生化学的性質を調査する。また、non-SMC サブユニットの機能単位の立体構造を決定し、その構造領域がどのようにして相互作用しているか、また真核生物のコンデンシン複合体分子の全体像について、染色体凝縮や細胞周期の観点で考察していく。

3. 研究の方法

(1) 基本的な方針として、まずコンデンシン複合体の機能ドメイン単離とその発現系

を構築した。実験材料は様々な種のコンデンシン複合体を用いて予備実験を行い、主に枯草菌類の蛋白質を以下の実験系に用いた。まず SMC と non-SMC サブユニットを共発現することによって得られる組換え体を精製し、プロテアーゼによる限定分解によって、サブユニット間の相互作用に関わる機能ドメインを単離・同定した。それらのフラグメントなどは MALD-TOF 質量分析によって同定確認した。また、得られた蛋白質の機能単位をゲルろ過によって均一性を確認し、核酸や ATP 各機能ドメイン間の相互作用をブルダウンアッセイなどで検証した。

(2) 非構造領域の少ない結晶化に適した構造単位を得ることができたものは、大量に精製し、スクリーニングキッドを用いて可能な限り様々な条件の下で結晶化を試みた。得られた結晶は、高輝度 X 線源を用いて回折実験を行い、その立体構造を決定した。構造解析の結果から、分子表面の進化的に保存されたアミノ酸の局在箇所を判断し考察した。

4. 研究成果

(1) 枯草菌のコンデンシン複合体の機能領域の同定

①ホモダイマーを形成する枯草菌の SMC サブユニットについては、その N と C 末端領域を共発現することにより ATP 加水分解ドメイン（ヘッドドメイン）のみを取り扱い、単一蛋白質として精製した。このとき、ヘッドドメインからヒンジ領域へ続くヘリックス領域の長さを変えた分子種を複数調製し、可溶化できる最適なものを選択した。このヘッドドメインは、ATP 非存在下のゲルろ過実験において、単量体で存在した。また、ヘッドドメイン内に存在する、1118 番目のグルタミン酸をグルタミンに変えた変異体蛋白質を調製した。この変異は、ATP 加水分解反応を担う活性残基の一つであり、反応を完結できないことが知られている。0.1mM の ATP 存在下でこの変異体を用いてゲルろ過を行ったところ、このヘッドドメインは確かに二量体を形成することがわかった。

②二種類の non-SMC サブユニット (ScpA, ScpB) は、それぞれ独立にまたは同時に発現できるコンストラクトを作製した。非常に可溶性の ScpB は二量体を形成した。一方で、ScpA は単独で発現させると不溶性を示した。しかしながら、ScpB との同時発現は、ScpA を ScpAB 複合体として可溶化するだけでなく、ScpA 自身の可溶性をも飛躍的に増大させた。これらのゲルろ過の結果から、この ScpA 蛋白質画分は単量体であり、ScpAB 複合体は 1:2 の比でヘテロ二量体を形成していた。こ

の結果から、ScpB は ScpA に結合することによって、ScpA のフォールディングを制御する因子として働いていることが強く示唆された (図 2)。

③ScpA-B-ヘッドドメイン複合体は、三者の蛋白質を同時発現し、精製することによって得られた。その分子量論比は電気泳動で判断する限り、およそ 2:2:2 であるように見えた。上述のヘッドドメイン変異体を含む複合体を用いてゲルろ過実験をおこなった結果、ATP の有無にかかわらず、メインの 120kDa の複合体のピークの位置は変わらなかった。ヘッドドメインのみの場合とは明らかに異なり、この三者複合体の分子状態は、ATP 加水分解活性を不活性化させるフォームであると推測された。

④同様に non-SMC サブユニット内の機能ドメインをプロテアーゼによる限定分解によって割り出し、物理的相互作用を調べた。ScpA は N 末端、中央、C 末端の三つの領域から構成され (図 1)、このうち N 末端から中央領域にかけて ScpB と強固に結合していた。ScpA の C 末端領域のみは、ScpB との結合に関与せず、SMC サブユニットのヘッドドメインと相互作用していた。しかしながら、全長 ScpA とヘッドドメイン、または N 末端領域を欠いた ScpA とヘッドドメインの結合は、比較的解離が速く進む傾向にあった。これには ScpA 自身の中央領域の存在する短いアミノ酸領域 (図 1, 2 黄色) が関与していると考えられた。実際、この中央領域を有する ScpA は、自身の C 末端領域と結合することができた。ScpA は自身の中央領域を利用し、ScpB の有無に依存して、non-SMC サブユニット間の

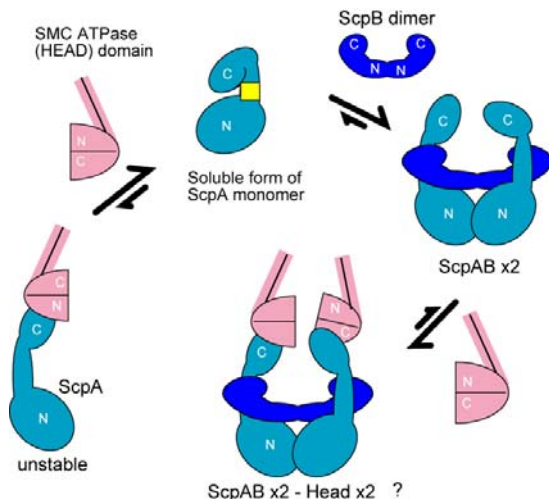


図 2 バクテリア non-SMC サブユニットの分子性状と SMC サブユニット (ヘッドドメイン) との結合形態

枯草菌の non-SMC サブユニットの機能ドメインの解析からわかった分子間の関係性を示した。

相互作用を制御し、分子内構造変化を誘導していると考えられた。このことはコンデンシン複合体の形成と解離の制御に直接結びついていると示唆された。

(2) 枯草菌のコンデンシンの機能領域の結晶化と構造解析

①ドメイン間領域の相互作用と構造変化を原子レベルで解明するため、ヘッドドメイン単独、ヘッドドメインと ScpA C 末端領域の複合体、そしてその ATP 結合型複合体の結晶を調製した (図 3)。これらは、SPRING-8 BL26B1 ビームラインで回折実験およびデータ収集を行い、およそ 2Å の分解能で立体構造解析を達成することができた (図 4)。

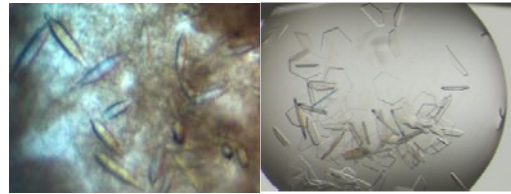


図 3 ヘッドドメイン単独の結晶 (左) ヘッドドメインと ScpA C 末端領域の複合体の結晶 (右)

②ヘッドドメインの全体構造は典型的な ATP 加水分解反応を担う ABC (ATP binding cassette) 蛋白質のフォールディングを有していた。すでに構造解析がされている SMC 蛋白質の一つであるコヒーシン蛋白質に相当

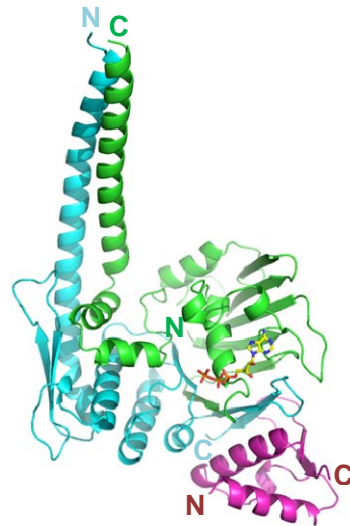


図 4 ヘッドドメインと ScpA C 末端領域と ATP の複合体の結晶構造

SMC ヘッドドメイン N 末端領域 (緑)、C 末端領域 (水色)、ScpA C 末端領域 (紫) をリボン図で示した。ソーキングによって結合した ATP をスティックモデルで示した。

する部分の構造とよく一致していた。ヘッドドメインに付属するコイルドコイル領域の構造はコヒーシオンと比べやや内側を向いており、コンデンシンの全体構造はより直線状であることが示唆された。

ScpA の C 末端領域の最後の α -ヘリックスとその β -シートのターン構造から提供される疎水性アミノ酸によって、SMC ヘッドドメインに強固に結合している。

ATP を soaking によって導入した結晶は ATP の電子密度が見えているだけでなく、R ループと呼ばれる SMC ヘッドドメインのアミノ酸領域 (51-62) がはっきりと現れていた。このループは ATP のプリン環から alpha phosphate までの部分を横たえる場所を induced-fit によって形成させており、ATP の適切なポジショニングを保證するのに重要と考えられた。

今後の展望として、ScpB がいかに ScpA の機能領域に構造変化を与えているかを原子レベルで解明することにより、一連の構造変化を視覚化することを目指す。また、生化学的、構造的に重要性が予想された制御サブユニットの領域が *in vivo* で機能しているかを分子遺伝学的手法によって検証する。特に ScpA のドメイン間を結ぶ領域が重要であると予測されるため、この領域に集中的に変異を導入し、コンデンシン複合体の形成とバクテリアの温度感受性を指標に、どのアミノ酸残基が重要であるかを特定する。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織
研究代表者
鎌田 勝彦 (KAMADA KATSUHIKO)
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・専任研究員
研究者番号:70360526