

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03194

研究課題名(和文) DNAカーテンと粗視化シミュレーションによるコンデンシン分子モーターの機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of a Condensin molecular motor explored by DNA curtain assays and coarse-grained molecular dynamics simulations

研究代表者

寺川 剛 (Terakawa, Tsuyoshi)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：20809652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：コンデンシンは、有糸分裂期に分子モーターとして染色体ループを形成することで、染色体凝縮を引き起こすタンパク質である。これまでの研究では、コンデンシンが染色体ループを形成する分子機構がわかっていなかった。本研究では、1分子蛍光イメージング(DNAカーテンアッセイ)と粗視化分子動力学シミュレーションを用いて、(i) コンデンシンのヒンジ領域が構造変化してDNAと結合できるようになること、(ii) コンデンシンはそのヌクレオチド状態に応じてことなる構造に変化すること、(iii) 障害物を避けられるトランスロケーションモードと避けられないモードがあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体凝縮は、複製されたゲノムDNAの娘細胞への正確な分配を保障する、生命の根幹をなす重要な現象である。本研究では、染色体凝集を引き起こすコンデンシンが、染色体ループを形成する分子機構を明らかにすることができた。これは、複製されたゲノムDNAが娘細胞に正確に分配されるしくみを明らかにするために重要な成果である。また、コンデンシンのように染色体の構造形成に関わるタンパク質の不全はCornelia de Lange症候群のような遺伝疾患を引き起こす。それらの深刻な疾患の分子機序の理解に重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Condensin is a molecular motor protein that induces chromatin condensation by forming DNA loops in mitosis. Molecular mechanisms of the DNA loop formation remains unknown. In this study, single molecule fluorescence imaging (DNA curtain assays) and coarse-grained molecular dynamics simulations revealed that (i) the conformational change of the Condensin hinge region enables DNA binding, that (ii) Condensin with distinct nucleotide states has different conformations, respectively, and that (iii) Condensin translocations have two modes, one of which can bypass obstacles on DNA.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子蛍光イメージング DNAカーテン 粗視化分子動力学シミュレーション コンデンシン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

染色体の構造とその変化は、DNA の転写・修復・複製に重要な役割を果たし、真核生物の根幹を支える現象である。したがって、染色体構造変化の分子機構の探究は、生命の根幹の理解にとって重要である。染色体構造変化を伴う重要な現象として、核内に分散している染色体は、有糸分裂期にコンパクトな棒状の構造に凝縮する。コンデンシンは、この構造変化をつかさどるタンパク質である。申請者は、これまでにコンデンシンの DNA 上における動態の 1 分子蛍光イメージングを行ってきた。そして、近年、コンデンシンが分子モーター (ATP の加水分解エネルギーを力学的エネルギーに変換して仕事をする分子) であることを明らかにした [Terakawa et al. Science (2017) 358:672]。また、コンデンシンが、染色体中のゲノム DNA にループを形成させることで、染色体を凝縮させることが明らかになった。しかし、コンデンシンがゲノム DNA にループを形成させる分子機構は明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、粗視化分子動力学シミュレーションと 1 分子蛍光イメージングを併用することで、1 分子蛍光イメージングだけでは明らかにすることができなかった、コンデンシン分子モーターの作動機構を解明することである。

### 3. 研究の方法

#### A) コンデンシンのヒンジ領域と DNA の複合体のモデリング

まず、粗視化分子動力学シミュレーションを用いて、コンデンシンの各サブユニットと DNA の複合体構造を予測するシステムを構築した。次に、高速原子間力顕微鏡を用いて、アデノシン三リン酸 (ATP) の存在下におけるコンデンシンの像を取得した。次に、それらの原子間力顕微鏡像を拘束条件として粗視化分子動力学シミュレーションを行うことにより、ヒンジ領域の開閉の構造変化をモデリングした。最後に、ヒンジ領域と DNA の複合体構造を、粗視化分子動力学シミュレーションによって予測した。

#### B) ヌクレオチド状態依存的なコンデンシンの構造変化の観察

まず、ATP- S、AMP-PNP、ADP の存在下、またはヌクレオチドの非存在下において、コンデンシンのサンプルを調整した。次に、高速原子間力顕微鏡を用いて、それらのサンプルの像を取得した。

#### C) ヌクレオソームを形成した DNA 上のコンデンシン動態の 1 分子蛍光イメージング

まず、DNA にかかる張力を変えて、5 種類の DNA カーテンを作成した。次に、それらの DNA 上にコンデンシンをロードして、その動態を 1 分子蛍光イメージングした。次に、リコンビナントヒストンタンパク質を大腸菌から精製した。次に、それらのヒストンタンパク質を用いて、ファージのゲノム DNA 上に 5 個程度のヌクレオソームを再構成した。次に、その DNA を用いて DNA カーテンを作成した。次に、その DNA カーテン上にコンデンシンをロードして、その動態を 1 分子蛍光イメージングした。

### 4. 研究成果

#### A) コンデンシンのヒンジ領域と DNA の複合体のモデリング

粗視化分子動力学シミュレーションを用いて、コンデンシンのサブユニット Ycg1 と DNA の複合体構造を予測した。その結果として得られた構造モデルは、複合体の構造モデルとほぼ一致した。この結果から、我々の粗視化シミュレーション手法は、コンデンシンのサブユニットと DNA の複合体をある程度の精度で予測可能であることが示唆された。

次に、高速原子間力顕微鏡を用いて、ATP の存在下におけるコンデンシンの像を獲得した。これらの像は、コンデンシンのヒンジ領域が開閉の構造変化を繰り返していることを明らかにし

た。これまでの結晶構造解析では、ヒンジ領域が開いた構造しか得られていなかった。したがって、この像はコンデンシンのヒンジ領域が開きうることを示した初めてのデータである。

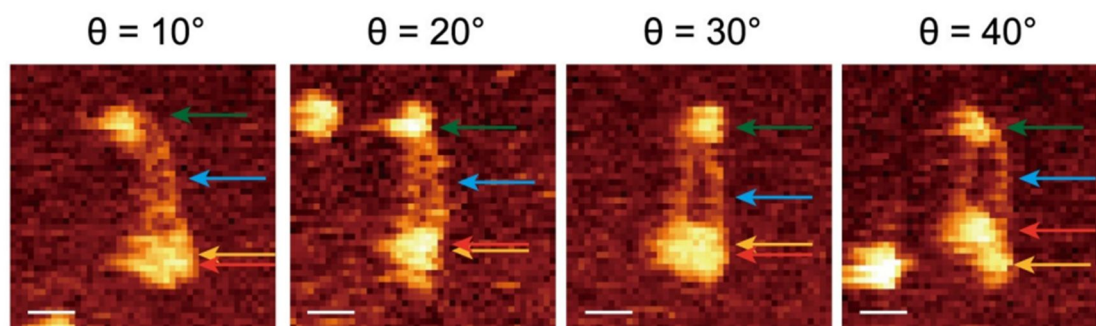


図1 ATPの存在下におけるコンデンシンのAFM像。緑の矢印はヒンジ領域を、水色の矢印はコイルドコイル領域を、赤色の矢印はヘッド領域を指す。

次に、それらの原子間力顕微鏡像を拘束条件として、コンデンシンのヒンジ領域の粗視化分子動力学シミュレーションを行った。ヒンジ領域が開いた像を拘束条件として用いた結果、ヒンジ領域が開いた構造を、1つのアミノ酸を1粒子で表現した精度でモデリングすることができた。この構造から、ヒンジ領域が開くと塩基性アミノ酸に富んだ領域が露出することが明らかになった。

最後に、開いたコンデンシンのヒンジ領域とDNAの粗視化分子動力学シミュレーションを行った。その結果、DNAは、ヒンジ領域が開くことで露出した塩基性アミノ酸に富んだ領域に結合することが予測された。この結果は、コンデンシンの大規模な構造変化と、DNAの結合部位の変化が共役していることを示唆した。これらの結果をまとめて論文化し、論文はPLoS Computational Biology誌に掲載された[Koide et al. PLoS Computational Biology (2021) 17:e1009265]。

## B) ヌクレオチド状態依存的なコンデンシンの構造変化の観察

高速原子間力顕微鏡を用いて、ATP- S、AMP-PNP、ADPの存在下、またはヌクレオチドの非存在下におけるコンデンシンの像を取得した。その結果、ATP- S、AMP-PNPの存在下では、コンデンシンは、コイルドコイル領域が開いた0字型の構造をとることがわかった。また、ADPの存在下では、ヘッド領域が開いたV字型の構造をとることがわかった。さらに、ヌクレオチドの非存在下では、コイルドコイル領域が閉じたI字型の構造をとることがわかった。これらの結果はコンデンシンが、ヌクレオチドの結合状態に応じて、異なる構造をとることを明らかにした。

## C) ヌクレオソームを形成したDNA上のコンデンシン動態の1分子蛍光イメージング

まず、張力が異なるDNA上のコンデンシンの動態を1分子蛍光イメージングした。その結果、張力が低いとコンデンシンのDNA上の歩進速度が速いモードになり、張力が高いと歩進速度が遅いモードになることが明らかになった。

次に、5個程度のヌクレオソームをランダムな位置に形成した、ファージのゲノムDNA上のコンデンシンの動態を1分子蛍光イメージングした。その結果、コンデンシンがDNA上を一方向している時にヌクレオソームと衝突すると、80%の確率でその位置で停止することが明らかになった。また、歩進速度が速いモードではヌクレオソームを乗り越えることができたが、歩進速度が遅いモードでは乗り越えることができなかった。これらの結果は、コンデンシンには、速い歩進モードと遅い歩進モードがあり、それぞれが別々の機能を果たしていることを示唆した。

染色体凝縮は、複製されたゲノムDNAの娘細胞への正確な分配を保障する、生命の根幹をなす重要な現象である。本研究では、染色体凝集を引き起こすコンデンシンが、染色体ループを形成する分子機構を明らかにすることができた。これは、複製されたゲノムDNAが娘細胞に正確に分配されるしくみを明らかにするために重要な成果である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harashima Takanori, Fujii Shintaro, Jono Yuki, Terakawa Tsuyoshi, Kurita Noriyuki, Kaneko Satoshi, Kiguchi Manabu, Nishino Tomoaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-molecule junction spontaneously restored by DNA zipper	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-25943-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagae Fritz, Brandani Giovanni B, Takada Shoji, Terakawa Tsuyoshi	4. 巻 49
2. 論文標題 The lane-switch mechanism for nucleosome repositioning by DNA translocase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 9066 ~ 9076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab664	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koide Hiroki, Kodera Noriyuki, Bisht Shveta, Takada Shoji, Terakawa Tsuyoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Modeling of DNA binding to the condensin hinge domain using molecular dynamics simulations guided by atomic force microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1009265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pcbi.1009265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 寺川剛
2. 発表標題 Reconstitution of protein functions on chromatin curtain
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺川剛
2. 発表標題 Reconstitution of protein functions on chromatin curtain
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayu S. Terakawa, Tsuyoshi Terakawa
2. 発表標題 Evaluation of DNA binding of yeast replisome toward single-molecule observation of DNA replication
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Inoue, Shoji Takada, Tsuyoshi Terakawa
2. 発表標題 Molecular mechanism of MutS sliding on DNA explored by coarse-grained molecular dynamics simulations
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fritz Nagae, Giovanni B. Brandani, Shoji Takada, Tsuyoshi Terakawa
2. 発表標題 The lane switch mechanism: Nucleosome repositioning induced by a DNA translocase
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Koide、Shoji Takada、Tsuyoshi Terakawa
2. 発表標題 Molecular dynamics simulations of the yeast condensin holo complex towards elucidation of the mechanism of DNA loop extrusion
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuyoshi Terakawa
2. 発表標題 Nucleosome repositioning dynamics upon collision with a translocase
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fritz Nagae、Giovanni B. Brandani、Shoji Takada、Tsuyoshi Terakawa
2. 発表標題 DNA translocase repositions a nucleosome by the lane-switch mechanism
3. 学会等名 20th IUPAB Congress（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------