

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06512

研究課題名(和文) FANCM-CENP-SX複合体の構造機能解析

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of FANCM-CENP-SX complex

研究代表者

西野 達哉 (Nishino, Tatsuya)

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・教授

研究者番号：50533155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CENP-SX複合体は真核生物の染色体分配とDNA修復に関与する。FANCMは全長2000アミノ酸を超える巨大タンパク質で、ヘリカーゼ、CENP-SX結合ドメイン、FAAP24結合ドメインを有するが、DNAの認識機構は不明である。本研究では各ドメインを発現精製し、生化学的、構造生物学的に解析した。蛋白質複合体の大量調整に成功し、DNA結合能を解析した結果、DNA長に応じて特異的な複合体を形成することが明らかになった。また、蛋白質DNA複合体の結晶化を行い、高分解能の結晶を得ることに成功した。今後この結晶の構造解析により、DNA結合モードの詳細が明らかになると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FANCM-MHF複合体は、DNA修復に関与するタンパク質です。遺伝情報を保持するDNAは、熱や紫外線、化学物質など様々な要因から損傷を受けることがあります。その中でもDNA鎖間架橋は有害で、DNAの2本の鎖が分離せず、複製や転写が中断されるため、ゲノムが不安定化し、生体機能に異常が生じます。この研究では、DNA鎖間架橋を修復する働きを持つFANCM-MHF複合体が、特定の条件下では解離することがわかりました。この発見は、これまで見過ごされていた複合体の性質や生体内での重要な現象を示唆しており、今後、DNA複合体との結合をさらに解析することで、より詳細な機構が明らかになると予想されます。

研究成果の概要(英文)：CENP-SX complex is involved in eukaryotic chromosome segregation and DNA repair. FANCM protein is 2000 amino acids long with a helicase domain, CENP-SX binding domain, and FAAP24 binding domain, but how it recognizes and functions with branched DNA is unknown. In this study, we expressed and purified each domain and analyzed them biochemically and structurally in order to solve this mystery. As a result, we succeeded in the preparation of recombinant protein complexes. DNA binding analysis revealed that they form distinct complexes depending on the DNA length. In addition, the protein-DNA complexes were crystallized, and high-resolution crystals were obtained which should reveal the details of the recognition.

研究分野：構造生物

キーワード：構造生物学 生化学 X線結晶構造解析 蛋白質DNA複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CENP-SX は、酵母からヒトに至るまで保存されているタンパク質複合体であり、染色体セントロメアに存在する動原体を構成する CCAN (構成的セントロメアネットワーク) 因子の一つである。一方、ほぼ同時期に FANCM と相互作用する MHF1/2 複合体としても同定され、ファンコニー貧血症候群 (FA) の原因を引 CENP-TWSX 複合体を形成し、染色体の分配に参与している。(Nishino et al., 2012 Cell, Nishino et al., 2013 EMBOJ)。また、FANCM/CENP-SX 複合体は、DNA 損傷によって停止した複製フォーク構造に結合し、組換え修復に参与することが知られている。(図1)しかし、FANCM 超複合体がどのように CENP-SX や他の複合体と協調して分岐構造に結合し、機能するか不明である。また CENP-SX が染色体分配と DNA 修復の 2 つにまたがって機能するかわかっていない。

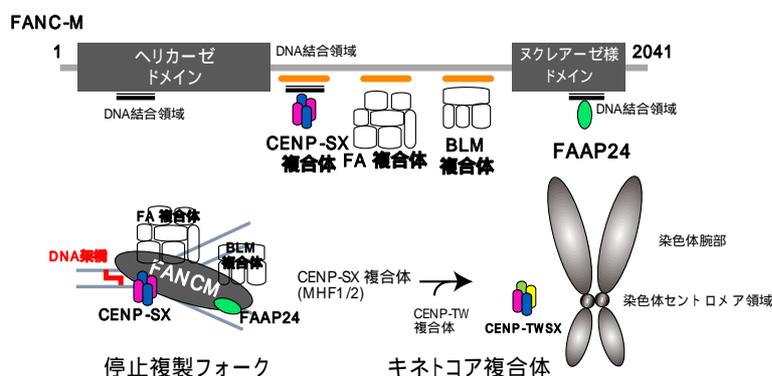


図1 FANCMのドメイン構造とCENP-SX複合体が関与するDNA修復/染色体分配機構

しかし、FANCM 超複合体がどのように CENP-SX や他の複合体と協調して分岐構造に結合し、機能するか不明である。また CENP-SX が染色体分配と DNA 修復の 2 つにまたがって機能するかわかっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FANCM/CENP-SX 複合体がどのように基質 DNA を認識し、正常な DNA 修復と染色体分配に貢献しているかを原子レベルで解明することである。

3. 研究の方法

FANCM-CENP-SX 複合体の生化学および構造生物学的解析のために、組換え蛋白質として大量発現と精製を行った。また、蛋白質 DNA 複合体の結晶化を行い放射光施設で回折測定を行った。さらに、ゲルシフト法を使用して蛋白質 DNA 複合体を生化学的に解析した。

4. 研究成果

1年目は、FANCM-MHF 複合体の安定性の分子的小および構造的基盤を明らかにすることを目的としてニワトリ FANCM (MHF 相互作用領域)、MHF1 及び MHF2 を含む組換え三者複合体を発現し、精製した。精製した三成分複合体を種々の条件下で結晶化し、類似の結晶化条件から三つの異なる結晶を得た。一方の結晶は FANCM-MHF 複合体を含むが、他方の結晶は FANCM を含まない MHF 複合体を含むことが判明したため、FANCM が MHF からどのように解離するかをさらに調べ、2-メチル-2, 4-ペンタンジオール (MPD) と酸化環境の存在が FANCM の放出を促進した可能性があることがわかった。しかし、これらの条件下では、MHF 複合体は維持されていた。FANCM-MHF 相互作用は疎水性/親水性相互作用が混在しており、ニワトリ FANCM はこの領域内にいくつかの非保存システインが存在し、それによって他の FANCM-MHF 分子との凝集を引き起こす可能性が考えられた。これらの結果は、FANCM-MHF 複合体が特定の条件下によって解離するという予想外の性質を示していた。これらの結果は論文として報告した。(Ito and Nishino 2021)。

2年目は、FANCM-MHF 複合体の DNA 認識機構の構造的基盤を明らかにすることを目的として生化学、構造解析を行った。まず、ニワトリ FANCM ヘリカーゼドメインを含むコンストラクトを作成した。現在 FANCM ヘリカーゼドメイン単独および FANCM ヘリカーゼ-MHF 複合体のコンストラクトより組換えタンパク質を発現精製している。精製タンパク質が得られ次第、生化学、構造解析を行う予定である。一方、昨年度結晶構造を報告した FANCM-MHF 複合体と CENP-SX 複合体に関しては両者の DNA 結合解析を詳細に行った。その結果、同じ DNA に対して結合のモードが異なることが明らかになった。特に FANCM-MHF は主に単一の複合体で結合するのに対して、CENP-SX は複数で結合していると思われる結果が得られた。さらに DNA との相互作用を原子レベルで明らかにすることを目的として、DNA との結晶化を行った。その結果、二重鎖 DNA と混合した条件で結晶を得ることに成功し、MHF (CENP-SX) 複合体と DNA との結晶化においても同様な結晶が得られた。SDS-PAGE および DNA 標識蛍光剤によって結晶を解析した結果、どちらも CENP-SX-DNA 複合体であることが判明した。これは、昨年度に報告したとおり、結晶化溶液中の有機溶媒や酸化条件によって FANCM が複合体より解離したものである。結晶に X 線を照射したところ、低分解能の回折が得られた。DNA の長さや末端形状、結晶化条件やクライオ条件を改善した結果、分解能が向上した。これらの結果は論文として報告した。(Ito and Nishino, 2022)

3年目は、前年発現精製を行った FANCM ヘリカーゼドメインの生化学的解析とクライオ電子顕微

鏡による構造解析を行った。生化学的解析では分岐構造を含む様々な二重鎖 DNA との結合をゲルシフト法により解析した。その結果、FANCM ヘリカーゼドメインは分岐構造を有した DNA に対して、より強く結合する事がわかった。一方、電子顕微鏡解析においては、ヘリカーゼドメインの分子量が約 80kDa と小さいため、測定に不十分であったことから、MBP との融合タンパク質を調整した。異なるタンパク質濃度や塩濃度において測定を行ったものの、試料像が明瞭でなく、データ測定には至っていない。現在は試料調製条件やタンパク質濃度、塩濃度や凍結条件の改善を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ito Sho, Nishino Tatsuya	4. 巻 78
2. 論文標題 Biochemical and crystallization analysis of the CENP-SX-DNA complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 193-199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X22003843	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 Yoshikawa M., Han Y.W., Fujii H., Aizawa S., Nishino T., Ishikawa M.	4. 巻 118
2. 論文標題 Cooperative recruitment of RDR6 by SGS3 and SDE5 during siRNA amplification in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2102885118	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 Ito Sho, Nishino Tatsuya	4. 巻 77
2. 論文標題 Structural analysis of the chicken FANCM-MHF complex and its stability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X20016003	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 Ikeda Akihito, Urata Seia, Ando Tadashi, Suzuki Yasuhiro, Sato Yasufumi, Nishino Tatsuya	4. 巻 76
2. 論文標題 The crystal structure of the tetrameric human vasohibin-1-SVBP complex reveals a variable arm region within the structural core	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 993~1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798320011298	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 伊藤翔、西野達哉	4. 巻 54
2. 論文標題 がん抑制遺伝子FANCMとゲノム安定性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 37-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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28件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田村青葉、西野達哉
2. 発表標題 好熱性細菌由来TT_C0005のタンパク質発現精製と結晶構造解析
3. 学会等名 2021年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西野達哉
2. 発表標題 Vasohibin-SVBP複合体の相互作用と構造機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本拓実、西野達哉
2. 発表標題 ヒトVASH1/SVBP複合体の立体構造機能解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯野菜摘、西野達哉
2. 発表標題 植物RNAサイレンシング増幅機構に関するSGS3の構造機能解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小栗健太郎、西野達哉
2. 発表標題 減数分裂組換え機構に関する植物由来SP011の構造機能解析に向けた発現条件検討
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林瑠、西野達哉
2. 発表標題 好熱性細菌由来Cytidine deaminaseのタンパク質発現精製と結晶構造解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村青葉、西野達哉
2. 発表標題 好熱性細菌由来TT_C0005のタンパク質発現精製と結晶構造解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本拓実、西野達哉
2. 発表標題 VASH1/SVBPの立体構造機能解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井戸海来、西野達哉
2. 発表標題 IMPACTタンパク質の発現精製と構造機能解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田悠理香、西野達哉
2. 発表標題 AID2法によるタンパク質高速分解の発現精製及び結晶構造解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野島涼平、西野達哉
2. 発表標題 新規プラスチック分解生物の創造
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大関彩香、西野達哉
2. 発表標題 大腸菌由来YraNタンパク質の発現精製と構造機能解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関大毅、西野達哉
2. 発表標題 ホルモン依存性がん関連遺伝子GREB1LのN末端領域の発現精製と機能解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関田貴弘、西野達哉
2. 発表標題 HP1結合によるCPC活性化機構解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋美名、西野達哉
2. 発表標題 超好熱性古細菌由来アルコールデヒドロゲナーゼの構造解析と生化学的解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沼野弘幸、西野達哉
2. 発表標題 好熱性細菌由来putative dCTP deaminaseの構造解析と生化学的解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林洋希、西野達哉
2. 発表標題 植物RNAサイレンシング増幅機構に関するSDE5の構造機能解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平嶋蓮、西野達哉
2. 発表標題 ヒト VASH2/SVBP の複合体解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪英大、西野達哉
2. 発表標題 CENP-SX および FANCM-CENP-SX の DNA 結合状態の比較検討
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 韓海峰、西野達哉
2. 発表標題 DNA修復機構因子FANCMのHelicaseドメインの構造機能解析
3. 学会等名 BIC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村青葉、西野達哉
2. 発表標題 Optimizing the purification of a DNA processing enzyme
3. 学会等名 第4回つくば精製フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野島涼平、西野達哉
2. 発表標題 Optimization of the recombinant secretory protein expression
3. 学会等名 第4回つくば精製フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤翔、西野達哉
2. 発表標題 CENP-SX 複合体による新規クロマチン形成
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田聡人、浦田せいあ、安藤格士、鈴木康弘、佐藤靖史、西野達哉
2. 発表標題 ヒト VASH1/SVBP 複合体の構造解析
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田聡人、山本拓実、西野達哉
2. 発表標題 Vasohibin ヘテロ四量体による酵素活性および分泌制御機構の提案
3. 学会等名 第15回Vasohibin研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西野達哉
2. 発表標題 VASH1-SVBP複合体の結晶構造から明らかになった自己調節機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会フォーラム ' チュープリン脱チロシン化酵素vasohibinの生物学 ' (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木浩斗、西野達哉
2. 発表標題 好熱性細菌由来putative dCTP deaminaseの構造解析と生化学的解析
3. 学会等名 BIC2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井戸海来、西野達哉
2. 発表標題 IMPACTタンパク質の発現精製と構造機能解析
3. 学会等名 BIC2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京理科大学先進工学部生命システム工学科、西野研究室ホームページ
<https://nishinotatsuya.wixsite.com/toopage>
 東京理科大学先進工学部生命システム工学科、西野研究室ホームページ
<https://nishinotatsuya.wixsite.com/toppage>

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